UC-NRLF
$B 174 345

...L TÉCNICO

DE

ANATOMÍA PATOLÓGICA

(AUTOPSIA — HISTOLOGÍA PATOLÓGICA — BACTERIOLOGÍA)

POR

S. RAMÓN Y CAJAL

Profesor de Histología normal y Anatomía patológica
en la Facultad de Medicina de Madrid

Y

J. F. TELLO Y MUÑOZ

Auxiliar, por oposición, de la misma asignatura en la Facultad
de Medicina de Madrid.

CON GRABADOS INTERCALADOS EN EL TEXTO

MADRID
IMPRENTA Y LIBRERÍA DE NICOLÁS MOYA
Garcilaso, 6, y Carretas, 8.

1918

GIFT OF
J.C.CEBRIAN

MANUAL TÉCNICO

DE

ANATOMÍA PATOLÓGICA

MANUAL TÉCNICO

DE

ANATOMÍA PATOLÓGICA

(AUTOPSIA—HISTOLOGÍA PATOLÓGICA—BACTERIOLOGÍA)

POR

S. RAMÓN Y CAJAL

Profesor de Histología normal y Anatomía patológica
en la Facultad de Medicina de Madrid

Y

J. F. TELLO Y MUÑOZ

Auxiliar, por oposición, de la misma asignatura en la Facultad
de Medicina de Madrid.

CON GRABADOS INTERCALADOS EN EL TEXTO

MADRID
IMPRENTA Y LIBRERÍA DE NICOLÁS MOYA
Garcilaso, 6, y Carretas, 8.

1918

BIOLOGY
LIBRARY

Es propiedad de los autores.

Gift of
J. C. Gebrian

UNIV. OF
CALIFORNIA

PRÓLOGO

Las primeras ediciones de nuestro *Manual de Anatomía patológica general* ofrecían al final un resumen de *Técnica micrográfica* destinado a servir de guía al alumno en el análisis y demostración de los procesos morbosos y de las bacterias patógenas, a menudo asociadas a las piezas patológicas.

Pero, considerando que hoy este breve repertorio de fórmulas no es suficiente, dado el pujante desarrollo alcanzado por las aplicaciones del microscopio a la clínica, y teniendo además en cuenta que en el citado resumen se echaban de menos algunos capítulos de valor práctico creciente, hemos decidido ofrecer al lector, en libro aparte, una exposición más completa de las reglas técnicas indispensables al anatomopatólogo y al médico para el diagnóstico preciso de las enfermedades y para la identificación, con fines clínicos, de las bacterias infecciosas.

Para cumplir en lo posible con tan arduo cometido, hemos solicitado la colaboración del Dr. D. Francisco Tello, *Auxiliar* de la Facultad de Medicina, *Jefe del departamento de Autopsias* y *Director* que ha sido por muchos años de la *Sección de Epidemias* del *Instituto nacional de Higiene*. Especializado en las prácticas de la exploración de tumores y en el estudio científico de las infecciones, su concurso nos ha sido precioso. No pocos capítulos del antiguo *Resumen* han sido considerablemente ampliados y hasta refundidos por nuestro ilustrado compañero.

Citemos los tocantes al *análisis de la sangre, experimentación en los animales, aislamiento de gérmenes,* la *identificación de microbios, técnica especial de los distintos microbios*. Algunos otros, por ejemplo, el relativo a la *Autopsia clínica,* uno de los más fundamentales del libro, se le deben por entero.

Gracias a tan valiosa cooperación, creemos sinceramente que el actual librito, donde se ha tratado de conciliar la brevedad con la eficacia, será útil, no sólo a los alumnos de *Anatomía patológica,* sino también al *médico práctico,* deseoso de disipar sus escrúpulos diagnósticos en los casos dudosos o difíciles en que es preciso recurrir al auxilio del microscopio y de la técnica micrográfica. Sólo han sido excluídos del texto, porque no podían entrar en nuestro plan ni ser abordados útilmente sin perjuicio de la concisión, los modernos procederes químicos de investigación de tumores, secreciones y demás líquidos orgánicos.

En suma; nuestro propósito ha sido poner en manos del alumno y del médico una especie de *Vademecum* donde se incluyan los consejos y normas prácticos más usuales encaminados a explorar científicamente los materiales morbosos recogidos, ora en el enfermo, ora en el cadáver, a partir de la autopsia clínica.

Al lector toca comprobar si en tal empeño nos ha acompañado la fortuna. En todo caso, excusará siempre nuestra pretensión el loable propósito de haber coadyuvado a la mayor eficiencia práctica de la enseñanza, y el disculpable deseo de enriquecer la literatura médica patria con un librito que estaba por escribir, y que nuestros sucesores podrán ampliar y perfeccionar debidamente.

S. Ramón Cajal.

Madrid, 8 de Julio de 1918.

ÍNDICE DE MATERIAS

Págs.

PRÓLOGO v

PARTE PRIMERA

LA AUTOPSIA CLÍNICA

Consideraciones generales 1
CAPÍTULO I. — *Instrumental* 2
CAPÍTULO II. — *Reglas generales de la autopsia* 8
CAPÍTULO III. — *Examen exterior del cadáver* 11
Examen interior. — 1. Cabeza 12
CAPÍTULO IV. — *2. Médula espinal* 21
CAPÍTULO V. — *3. Tronco* 24
CAPÍTULO VI. — *Exploración del pecho* 26
CAPÍTULO VII. — *Examen del abdomen* 37
4. Miembros 46
CAPÍTULO VIII. — *Separación del material necesario para el examen histopatológico y bacteriológico y preparación de piezas de museo* 46
CAPÍTULO IX. — *Reconstrucción del cadáver* 50

PARTE SEGUNDA

HISTOLOGÍA PATOLÓGICA

A) **Técnica general** 53
CAPÍTULO I. — I. *Elección de microscopio* 53
II. *Microtomos* 56
CAPÍTULO II. — I. *Fijación e induración de las piezas patológicas* 59
II. *Decalcificantes* 63
III. *Eliminación de los pigmentos y de la grasa* 65
CAPÍTULO III. — *Obtención de cortes observables al microscopio* 65

Págs.

A) Cortes sin inclusión..... 65
B) Métodos de inclusión para facilitar la ejecución de cortes finos..... 67
Inclusión en celoidina..... 68
Inclusión en parafina..... 69
Capítulo IV. — *Seriación, adherencia y montaje de los cortes en porta-objetos*..... 73
I. Cortes a la celoidina..... 73
II. Cortes a la parafina..... 75
Capítulo V. — *Coloración de los cortes*..... 76
Consideraciones generales..... 76
A) Coloraciones nucleares..... 77
1. Carmín..... 77
2. Hematoxilina..... 81
3. Anilinas..... 84
B) Coloraciones nucleares y protoplásmicas y de las substancias intercelulares. Métodos de doble y triple coloración..... 85
C) Coloraciones de las granulaciones intracelulares, inclusiones y otras estructuras protoplásmicas.. 94
D) Coloraciones especiales de las fibras colágenas, de reticulina y elásticas..... 96
Capítulo VI. — *Conservación de las preparaciones*..... 101
Bálsamo del Canadá..... 101
B) **Técnica especial de las lesiones generales**..... 103
Capítulo VII. — I. *Degeneración grasienta*..... 103
II. *Degeneración glucógena*..... 106
III. *Degeneración amiloide*..... 108
IV. *Degeneración coloidea y hialina*..... 109
V. *Degeneración mucosa*..... 110
VI. *Degeneración turbia*..... 111
VII. *Infiltración calcárea*..... 112
VIII. *Degeneración córnea*..... 113
IX. *Pigmentación hemática*..... 113
X. *Trastornos vasculares*..... 114
XI. *Inflamación*..... 116
XII. *Tumores*..... 116
C) **Técnica especial de los sistemas y órganos**..... 118
Capítulo VIII. — *Sangre*..... 118
I. Extracción..... 118
II. Examen cuantitativo de sus elementos..... 120
III. Examen cualitativo de sus elementos formes..... 128

Págs.

A) Métodos generales de coloración..... 132
B) Coloraciones especiales..... 138
IV. Determinación de la proporción de las distintas variedades de leucocitos..... 140
V. Demostración de los parásitos de la sangre..... 141
CAPÍTULO IX. — I. *Órganos hematopoiéticos*..... 142
II. *Examen citológico de los exudados*..... 146
CAPÍTULO X. — I. *Aparato circulatorio*..... 150
II. *Aparato respiratorio*..... 150
III. *Aparato digestivo*..... 152
IV. *Aparato urinario*..... 156
V. *Cápsulas suprarrenales y paraganglios*..... 157
VI. *Aparato genital*..... 158
CAPÍTULO XI. — *Sistema nervioso*..... 159
I. Reglas generales..... 159
II. Métodos morfológicos para la demostración de las neuronas..... 161
III. Métodos especiales de los grumos cromáticos..... 166
IV. Métodos neurofibrillares y de las fibras nerviosas. 167
A) Procederes con colores de anilina..... 168
B) Impregnación argéntica de las neurofibrillas.. 170
V. Métodos para la coloración de la neuroglia..... 174
VI. Métodos para la demostración de la mielina normal y patológica..... 182
A) Procederes negativos o tardíos..... 182
B) Procederes positivos o precoces..... 189
CAPÍTULO XII. — I. *Aparato locomotor*..... 190
II. *Piel*..... 194

PARTE TERCERA

TÉCNICA BACTERIOLÓGICA

A) **Técnica bacteriológica general**..... 197
CAPÍTULO I. — *Procedimientos para la observación de los microbios*..... 197
I. Examen de los microbios sin teñir sobre fondo iluminado..... 197
II. Examen sin teñir sobre fondo obscuro..... 201
III. Coloración de los microbios..... 204
1.° Consideraciones generales..... 204
2.° Métodos generales del teñido de las bacterias. 207

Págs.

3.° Método de Gram y sus modificaciones..... 212
4.° Teñido de las cápsulas..... 215
5.° Coloración de los esporos..... 216
6.° Coloración de los flagelos..... 218
CAPÍTULO II. — *Cultivo de los microbios*..... 227
I. Procedimientos de esterilización..... 227
A) Por el calor..... 227
1.° Calor seco..... 228
2.° Calor húmedo..... 231
B) Filtración..... 236
C) Esterilización por medio de antisépticos..... 244
II. Preparación de los medios de cultivo..... 245
1. Medios de cultivo de origen animal..... 245
A) Artificiales..... 245
B) Naturales..... 254
2. Medios de cultivo de origen vegetal..... 258
III. Métodos generales empleados en el cultivo de los microbios..... 259
1. Siembra..... 259
2. Incubación..... 263
3. Incubación de los microbios anaerobios..... 273
CAPÍTULO III. — *Experimentación en los animales*..... 276
1. Inoculación..... 277
2. Observación de los animales inoculados..... 283
3. Autopsia..... 284
CAPÍTULO IV. — *Aislamiento de gérmenes*..... 287
I. Procedimientos mecánicos o generales..... 287
1. Por dilución..... 287
2. Por diseminación..... 288
II. Procedimientos biológicos o especiales..... 294
1. Por mayor resistencia a la esterilización..... 294
2. Por cultivo en condiciones eugenésicas para el microbio que se busca y disgenésicas para los demás..... 296
3. Por inoculación a los animales..... 297
4. Procedimientos mixtos..... 298
CAPÍTULO V. — *Identificación de los microbios aislados*..... 299
I. Métodos empleados en la demostración de algunas propiedades fisiológicas..... 300
II. Métodos de estudio de las reacciones biológicas... 311
1. Acción antitóxica..... 311
2. Aglutinación..... 312

Págs.

A) Macroscópica..... 312
B) Microscópica..... 319
C) De orientación..... 320
D) En las infecciones asociadas..... 321
3. Precipitación..... 322
4. Acción bactericida..... 323
A) Reacción de Pfeiffer..... 323
B) Demostración de la acción bactericida *in vitro* 326
5. Fijación del complemento. (Reacción de Bordet y Gengou)..... 327
Preparación de los elementos que la integran... 328
Dosificación de los distintos elementos..... 329
Reacción de fijación del complemento con suero desconocido..... 332
Prueba completa para la identificación de un antígeno..... 333
CAPÍTULO VI. — *Técnica especial de los distintos microbios patógenos*..... 334
1.° Cocos Gram-positivos. Estafilococos, estreptococos y pneumococos..... 334
2.° Cocos Gram-negativos. Gonococos y meningococos. 340
3.° Bacterias Gram-negativas del grupo Eberth-coli-disentería..... 342
4.° Bacterias Gram-negativas capsuladas, tipo pneumobacilo de Friedländer..... 350
5.° Bacterias Gram-negativas del grupo de la septicemia hemorrágica..... 350
6.° Bacterias Gram-negativas hemoglobinófilas, tipo bacilo de Pfeiffer..... 352
7.° Bacterias Gram-positivas del grupo diftérico..... 353
8.° Bacterias Gram-positivas ácido-resistentes. Tipo bacilo tuberculoso..... 358
9.° Actinomicosis..... 365
10. Bacilo del muermo..... 366
11. Bacilo Gram-positivo de la pústula maligna..... 368
12. Bacilos anaerobios Gram-positivos. Tétanos, edema maligno, carbunco sintomático, botulismo, gangrena gaseosa..... 369
13. Vibriones. Cólera morbo asiático, cólera nostras.. 370
14. Espirochete de la sífilis..... 373
15. Espirilo de Obermeier..... 378
Índice alfabético..... 381

PARTE PRIMERA

LA AUTOPSIA CLÍNICA

Consideraciones generales.

La autopsia constituye el elemento primordial de la técnica de la anatomía patológica; a ella debió su engrandecimiento durante la segunda mitad del siglo pasado. Aun en estos últimos tiempos, en que la patología experimental contribuye poderosamente al esclarecimiento de gran número de procesos, sigue conservando un lugar preeminente, ya que los datos que ésta nos suministra, en la mayor parte de los casos han de ser recogidos mediante autopsia completa y minuciosa.

Para que la autopsia sea completa no ha de limitarse, como ocurría en casi todo el mundo antes de Virchow, y sucede en la actualidad en nuestro país, al estudio de los órganos que se suponen enfermos según el diagnóstico clínico, sino que ha de ser la revisión metódica de todos los órganos, primero con la simple vista y después con el microscopio, los reactivos químicos y cuantos medios auxiliares consientan la penetración en los trastornos íntimos de los tejidos y humores. El que verifica una autopsia solamente verá satisfecha su conciencia cuando haya tomado nota de todas las lesiones que se encuentren, las haya valorado lógicamente para deducir la causa de la muerte y, finalmente, haya puesto de manifiesto la causa o causas del proceso.

En muchas ocasiones la causa de la enfermedad, instantánea o fugaz en su acción (acciones mecánicas, térmicas, químicas, etc.), no se encuentra en el cadáver, y debe ser deducida del estudio de las alteraciones que motivó; pero existe un gran grupo de enfermedades, las infecciosas y parasitarias, en

BIBLIOTECA

que el agente productor se encuentra en los tejidos enfermos, y es posible su demostración en el momento de la autopsia, resolviendo de plano la etiología y naturaleza del proceso; en su presencia, el anatomo-patólogo no habrá cumplido dignamente su misión si, en posesión de los necesarios conocimientos bacteriológicos, no realiza cuantas indagaciones sean precisas para poner de manifiesto el germen que las produjo.

Esta es la razón de que en los planes de enseñanza de casi todas las naciones, y España entre ellas, sea el catedrático de Anatomía patológica el encargado de enseñar la bacteriología de los microbios patógenos y de que en sus prácticas deba corresponder gran parte a la técnica bacteriológica. Siguiendo este criterio, la *Técnica de la Anatomía patológica* comprenderá tres partes: la de la autopsia clínica, la de la histología patológica y la de los microbios patógenos (la técnica parasitológica debe ser reservada para su especial asignatura).

CAPÍTULO PRIMERO

INSTRUMENTAL

Los instrumentos necesarios en las autopsias diferéncianse poco de los utilizados en la práctica corriente de la disección, en relación con el distinto modo de trabajar. Las diferencias más marcadas se encuentran en los destinados a la sección de las partes blandas; atento el disector al objeto especial que trata de demostrar, realiza, por regla general, cortes numerosos, no muy extensos y poco profundos, procediendo, en una palabra, por grados, con relativa despreocupación de lo que separa, en tanto que el anatomo-patólogo, no sabiendo lo que ha de encontrar, debe conservar las relaciones entre todas las partes y tejidos, para poder efectuar en todo momento una reconstrucción de lo seccionado, y esto no puede conseguirse si no se practican secciones amplias, de una sola vez, en toda la profundidad del plano. Por otra parte, los grandes cortes permiten formar un claro juicio sobre el estado normal o patológico de los órganos seccionados, y abrevian la autopsia, que

se eternizaría si hubiera de practicarse con la técnica conveniente para la disección.

Por estas razones, Virchow (Rudol Virchow: *Die Sections-Technik im Leichenhause des Charité-Krankenhauses mit besonderer Rücksicht auf gerichtsärztliche Praxis,* 1893) preconizaba el empleo de un *cuchillo* con una hoja de 14 centí-

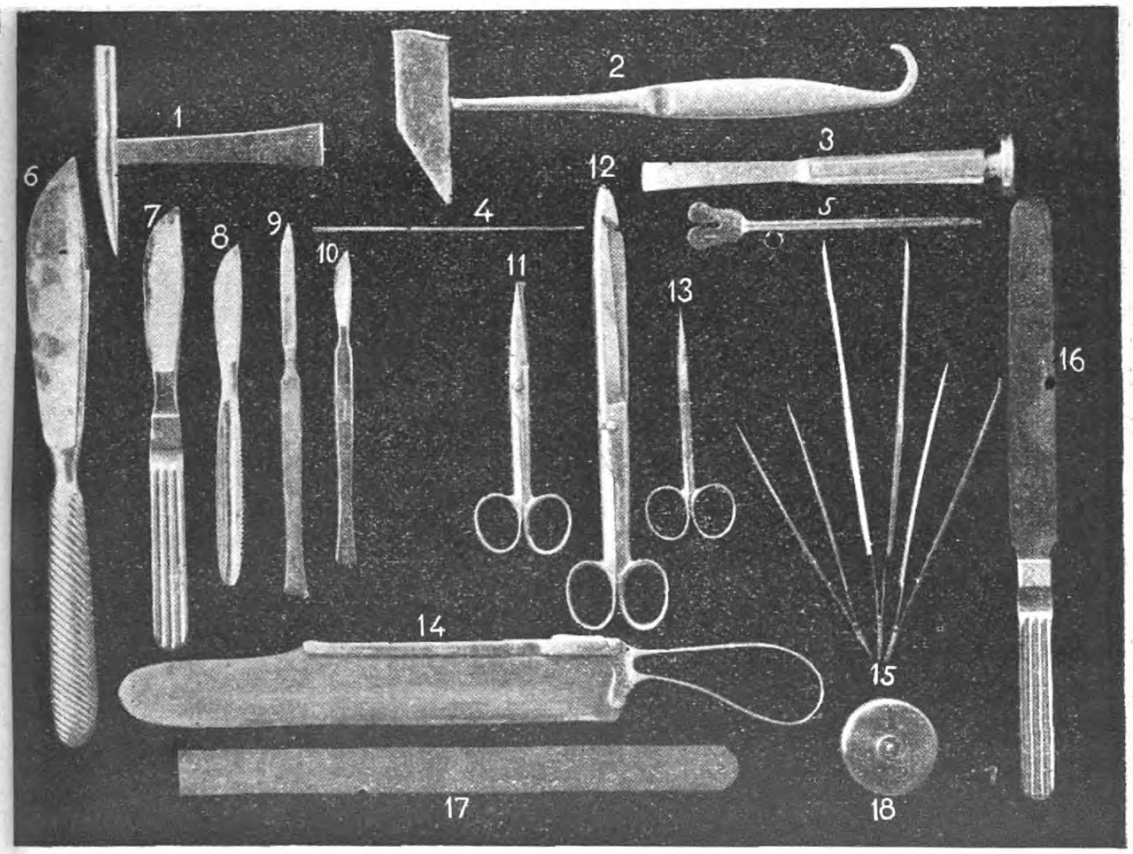


Fig. 1. — Instrumentos usados en una autopsia en general. — 1, escoplo en T; 2, martillo; 3, escoplo; 4, estilete; 5, sonda acanalada; 6, cuchillo de Virchow; 7, condrotomo; 8, 9 y 10, bisturíes; 11, tijeras comunes; 12, enterotomo; 13, tijeras finas; 14, sierra; 15, pinzas; 16, cerebrotomo; 17, regla métrica; 18, cinta métrica.

metros de longitud, ancha, y con el borde cortante en forma de vientre y un grueso mango de 10 centímetros. Este cuchillo fué aceptado por casi todos los anatomo-patólogos y médico-legistas, siendo hoy de universal empleo (fig. 1, *6*).

Para la sección de los cartílagos y tejidos fibrosos duros es

preciso un *cuchillete* de unos 8 centímetros de hoja, ancha también y en forma de vientre, y con un lomo muy grueso, sobre el que se apoya el índice o el pulgar, para ejercer una fuerte presión y provisto igualmente de fuerte mango (fig. 1, *7*).

Además son necesarios uno o dos *escalpelos* (fig. 1, *8, 9* y *10*) para preparar determinadas regiones u órganos y un *cerebro-*

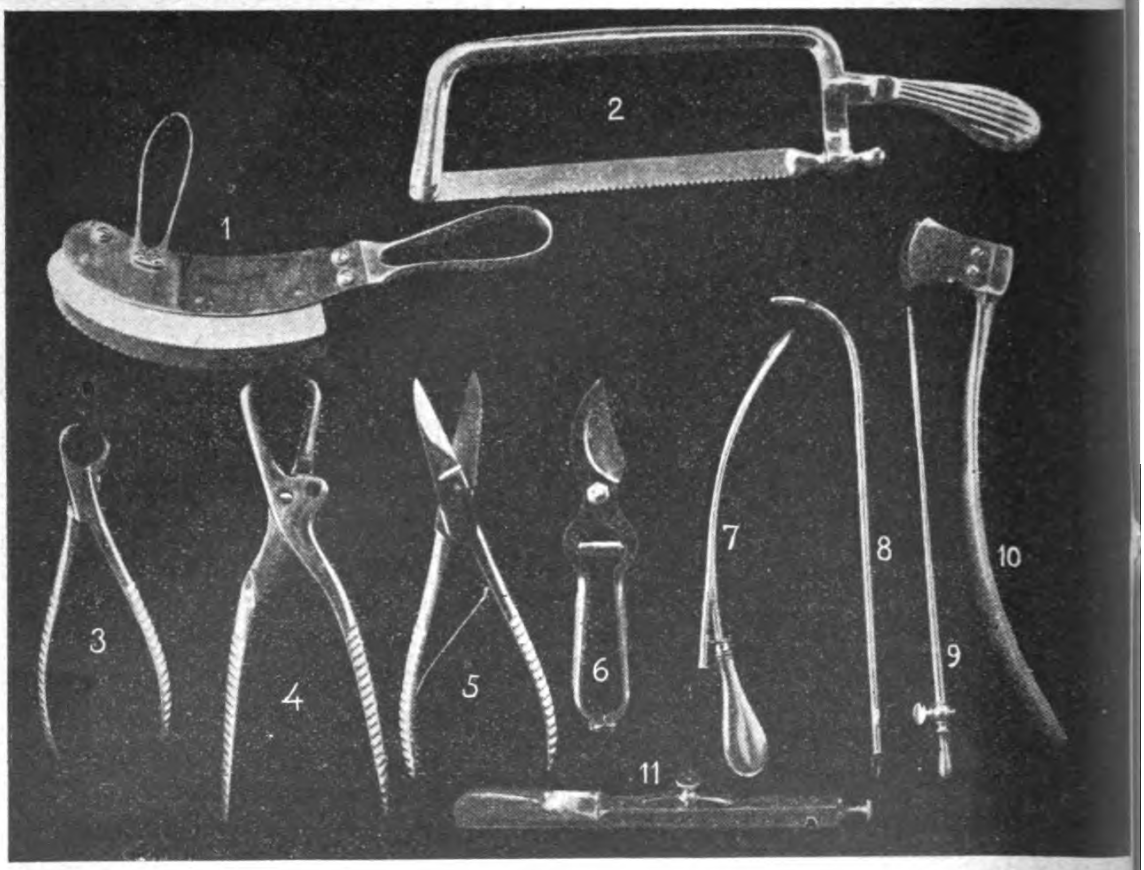


Fig. 2. — Otros instrumentos utilizables en las autopsias. — 1, raquitomo; 2, sierra de arco; 3 y 4, pinzas para hueso; 5 y 6, tijeras para huesos; 7, trócar; 8, sonda uretral: 9, tubo para insuflar; 10, doble escoplo para vértebras; 11, cuchillo doble para secciones microscópicas.

tomo, a modo de espátula, cortante en sus dos bordes, fina, de unos 25 centímetros de largo por 4 de ancho (fig. 1, *16*).

La *tijera* para la apertura del intestino, enterotomo (fig. 1, *12*), tiene dos hojas desiguales: una más larga, de unos 21 centímetros, con el extremo redondeado o revuelto en forma de

gancho, y la otra de 2'5 centímetros, más corta. Para la apertura de los bronquios y vasos de algún grosor se utiliza una tijera de tamaño corriente (fig. 1, *11*), con uno de los extremos en botón, y no está demás el disponer de una tijera pequeña y fina, con uno de los extremos en botón, para seccionar los vasitos finos (fig. 1, *13*).

Las *pinzas* son las corrientemente empleadas en disección y cirugía, y lo mismo ocurre con las sondas, estiletes, escoplos, martillos, sierras, cizallas, costotomos, gubias, legras, compás de gruesos, cinta métrica, grandes agujas de sutura para la reconstrucción, etc.; pero debemos indicar que, aunque sea conveniente la posesión de un abundante instrumental para responder a una porción de casos particulares que pudieran presentarse, la autopsia en general no requiere más que un limitado número de instrumentos, y es preferible la adquisición aislada de los escasos instrumentos precisos a la de las clásicas cajas de autopsias, que responden siempre a las necesidades de su autor y no a las especiales de cada uno y son mucho más costosas.

Al hablar de las distintas indagaciones especiales que deban ser practicadas en una autopsia expondremos los instrumentos precisos para realizarlas.

Sala de autopsias. — El principio fundamental que ha de presidir a su arreglo, y que no debe ser olvidado un momento, es la limpieza, que no debe ser inferior a la que reine en la sala de operaciones más perfecta, pues si en éstas existe constantemente el peligro de la infección del enfermo, en aquéllas, enfermedades diversas y graves pueden transmitirse al personal que las efectúa, y hasta ser transmitida por él a personas extrañas a estos asuntos. En caso de necesidad, las autopsias, como las operaciones quirúrgicas, podrán ser practicadas en una habitación cualquiera, siempre que no se olvide dicho principio fundamental; pero una sala de autopsias bien dispuesta tendrá las paredes y el piso lisos y lavables, lavabos con agua corriente para la asepsia del personal y el menor número posible de objetos.

La *mesa de autopsias* (fig. 3), formada por un tablero resistente y pulimentado, de mármol, pizarra, lava esmaltada, hierro, etc., apoyado sobre cuatro patas o una sola columna

central, deberá estar dotada de agua corriente, de pendientes

Fig. 3.—Disposición del operador y del material durante la autopsia. Momento de abrir la cavidad peritoneal.

suaves para que el agua se recoja en un sumidero central o

excéntrico y un desagüe que dirija estas aguas sucias a la conducción general. Cuando en esta sala de autopsias han de practicarse las de cadáveres de enfermedades infecciosas muy contagiosas, las aguas sucias serán conducidas a un depósito donde se reunan las de cada día y sean sometidas a la acción del hipoclorito cálcico o algún otro antiséptico durante veinticuatro horas, antes de darles salida.

Una mesa auxiliar aséptica soportará las balanzas, reactivos, instrumentos necesarios para las indagaciones bacteriológicas, serológicas e histológicas que deban ser practicadas en el momento de la autopsia; otra servirá para sentar el protocolo en el libro correspondiente; bandejas de hierro esmaltado contendrán los instrumentos (fig. 3) y las vísceras (fig. 3); zócalos de madera (fig. 3) o de metal permitirán levantar la cabeza o determinadas partes del cadáver, y, finalmente, un recipiente anejo a la misma mesa de autopsias o separado, pero inmediato a ella, lleno de agua circulante, servirá para el lavado de las vísceras cuando deba practicarse (fig. 3).

Excusado es decir que la iluminación será intensa.

Vestido del personal. — El encargado de ejecutar la autopsia protegerá sus vestidos con amplia blusa blanca, que dejará al descubierto los brazos desnudos, y llegará hasta cerca de los pies, abrochada por detrás y con cintas que ciñan en la cintura (figura 3). Encima de la blusa, por delante, un delantal impermeable de goma, hule, etc., proporcionará una defensa más completa y los pies serán igualmente protegidos por chanclos de goma.

El personal auxiliar estará provisto de las mismas prendas, y, en general, todo el que presencie la autopsia, aun sin tomar parte activa en ella, vestirá una blusa que le defienda contra la salpicadura de líquidos, imposible de evitar en muchas ocasiones, aun contando con la pericia de los que trabajan.

Las manos y antebrazos del que practica la autopsia se defienden mejor de la infección y del molesto olor que queda después empleando guantes de goma, que en cuanto se adquiere alguna práctica no molestan lo más mínimo; en caso de no disponer de guantes, algunos aconsejan el embadurnamiento de manos y antebrazos con aceite, vaselina, etc., para que forme una capa protectora contra los microbios en suspensión en los líquidos acuosos.

CAPÍTULO II

REGLAS GENERALES DE LA AUTOPSIA

La autopsia debe ser practicada por una sola persona, colocada al lado derecho del cadáver y con instrumental dispuesto de tal modo, que esté facilmente al alcance de su mano (fig. 3); sólo en contadísimos momentos será precisa la intervención de un ayudante. Muchas de las heridas que se producen durante las autopsias, son debidas a la presencia simultánea en el campo operatorio de las manos de varios individuos, y como basta asistir a una autopsia bien hecha para convencerse de la inutilidad de los ayudantes, no dejaremos de insistir en que se prescinda de ellos, mientras sea posible.

Durante la extracción del cerebro y la observación de la base del cráneo, el operador se colocará enfrente de éste; de la misma manera podrá ser ésta la posición preferible en algunos momentos de la extracción de la médula; en la observación de órganos determinados podrá convenir, según diremos, el colocarse al lado izquierdo; mas repetimos, que en casi todas las autopsias la posición del que la practica deberá ser la indicada.

La pulcritud más exquisita reinará durante toda la autopsia: el operador tendrá especial cuidado de evitar las salpicaduras de líquidos; mantendrá constantemente limpios los antebrazos y manos por frecuentes inmersiones en el depósito de agua corriente; no dejará en la bandeja ningún instrumento que haya empleado sin sumergirlo en agua; no se trasladarán los órganos de una parte a otra sin colocarlos en una bandeja, y, en fin, cuando no esté contraindicado, una capa de agua corriente lavará continuamente la mesa. Se lavará inmediatamente toda mancha que se produzca en el suelo o donde sea.

Todos los instrumentos de corte deberán estar cuidadosamente repasados por la piedra, para que seccionen sin aplastar, y si se trabaja debidamente, se conservan en este estado durante toda la autopsia y hasta en dos, siendo ésta una de las señales más claras de la pericia del operador. El gran cuchillo introducido por Virchow, debe ser cogido por el puño a plena mano, abrazando todo el mango, con el pulgar por un lado y

los demás dedos por el otro, hasta el encuentro del pulgar; fuertemente sujeto de este modo, como si fuera una rígida continuación del antebrazo, sólo puede ser movido por los movimientos de éste, verificando cortes largos y de la profundidad debida, existiendo siempre una relación bien clara entre la rapidez y la presión con que se verifica, pues si la presión es fuerte y el movimiento lento, se machacan los tejidos, y si la presión es deficiente y el movimiento rápido, la sección no alcanza la profundidad debida. Cuando hayan de ser cortados tejidos bastante duros o blandos sobre planos óseos, se utilizará el condrotomo cogido de la misma manera, pero apoyando el índice sobre el lomo; finalmente, cuando se utilicen los escalpelos se sujetarán entre los dedos como las plumas de escribir, efectuando secciones de 1 a 2 centímetros mediante movimientos de los dedos y la muñeca. Respecto de los demás instrumentos, nada especial tenemos que decir, debiendo aplicarse los conocimientos adquiridos en la sala de disección; solamente hemos de llamar la atención sobre la conveniencia de que todos sean depositados en la bandeja en tanto no se empleen y aconsejar que, ni aun momentáneamente, se abandonen sobre la mesa, o sobre el cadáver.

Es conveniente el seguir una pauta en la realización de las autopsias, porque esto acelera el trabajo y evita los olvidos; pero no deben constituir tales pautas, cauces rígidos que maten toda iniciativa. Es más, con frecuencia, en presencia de determinados casos particulares, será muy conveniente el abandonar en parte las normas establecidas. Por esta razón, resulta muy conveniente, siguiendo a Virchow, marcar las bases sobre que se funda el procedimiento adoptado, para que el operador, ateniéndose a los mismos principios, pueda modificar la pauta según lo exijan las circunstancias. Estas bases son:

a) Alterar lo menos posible el aspecto exterior, para no herir los sentimientos de la familia que ha de recibir el cadáver después. Para ello, las secciones de la piel serán lo menos numerosas que sea posible, y se verificarán en sitios que queden cubiertos por el vestido o por el pelo, no debiéndose seccionar en modo alguno la cara y parte superior del cuello y las manos.

b) Hacer la autopsia de las distintas cavidades en un orden

tal que la extracción de los órganos de una de ellas no modifique el aspecto de los que quedan en las no exploradas todavía. Un factor importantísimo a este respecto es la cantidad de sangre que contienen y puede ser notablemente alterado, siendo esta la razón de que deba comenzarse por la cabeza, continuando con la cavidad raquídea y terminando por tórax y vientre. En el orden entre estas dos cavidades interviene un nuevo factor, que es la modificación que en la posición del diafragma y las vísceras abdominales se produce en cuanto se abre la cavidad torácica; pero como para el juicio de la cantidad de sangre contenida en el corazón y los grandes vasos conviene que preceda la autopsia de los órganos del pecho, se crea un conflicto fácilmente soluble, pues basta observar la altura del diafragma y la posición y aspecto de las vísceras abdominales en cuanto, por la incisión media que describiremos después, se abre el vientre, y practicar a continuación la autopsia completa del pecho y más tarde la del vientre.

c) Dentro de cada cavidad se procederá primeramente a la observación cuidadosa del aspecto y situación relativa de los distintos órganos, y luego se extraerán, procurando hacerlo aisladamente o por grupos, de modo que la extracción de los unos no perjudique a la de los que queden.

d) Las secciones de cada órgano deben ser amplias pero no completas, para que unidas a modo de abanico permitan la reconstrucción en caso de necesidad.

e) La autopsia será completa, es decir, de todas las cavidades y órganos, no debiendo de prescindirse de ninguno, ya que siempre es posible el encuentro de lesiones no sospechadas.

El protocolo debe ser redactado a medida que se recogen las observaciones, porque de otro modo se corre el riesgo de olvidar un gran número de datos que fueron confiados a la memoria.

En la redacción del protocolo deben describirse con la mayor precisión posible los caracteres de los distintos órganos, empezando por la totalidad y pasando después a los particulares, prescindiendo en lo posible de palabras que sean expresiones de juicios formados por el operador, y aunque tal regla esté principalmente dirigida a los que realizan una autopsia sin preparación suficiente, no debe olvidarse que aun los más

peritos pueden ser, con frecuencia, inducidos a error, comprobado después en el estudio microscópico. A estas palabras, que representan juicios, corresponden: *normal, orina, pus, necrosis, empequeñecido, engrosado,* etc. En la reseña de un órgano explorado en su totalidad se tendrá en cuenta su *forma,* sus *dimensiones* y *peso,* su *color,* su *consistencia* y el *contenido en sangre;* en los órganos pares se compararán los dos, y en los que despidan olor manifiesto se hará notar sus caracteres. Al verificar las secciones de los distintos órganos se describirá el aspecto de las superficies de sección y los líquidos y gases que se escapen o estén contenidos.

No debe considerarse terminada una autopsia hasta que se han practicado todas las indagaciones derivadas (histológicas, bacteriológicas, serológicas, químicas).

CAPÍTULO III

EXAMEN EXTERIOR DEL CADÁVER

Este examen, que en las autopsias judiciales tiene mucha importancia, porque proporciona una gran cantidad de datos para la persecución de los delitos y la identificación de las víctimas, en las autopsias clínicas tiene menor transcendencia. De todos modos, debe ser detenidamente observado el cadáver, primero en conjunto, para anotar la edad aparente, dimensiones, conformación, estado de nutrición y panículo adiposo, desarrollo de la musculatura y tensión de la piel; a continuación serán examinadas las distintas partes del cuerpo, cabeza, tronco y extremidades, consignando en todas ellas el aspecto de la piel y pelo, la existencia de exantemas, hemorragias, heridas, escoriaciones, úlceras, fístulas, cicatrices, manchas cadavéricas, de la putrefacción o por heces, pus, sangre, etc.; la presencia de tumoraciones, edemas, fracturas; se observarán cuidadosamente los ojos, nariz, boca, oídos, ano y genitales, y, finalmente, se investigará el estado de la rigidez cadavérica, no sólo en los brazos, porque éstos son con frecuencia

violentados cuando la rigidez ya se ha establecido y la pierden, sino en todas las otras articulaciones.

Pequeñas incisiones permitirán, por regla general, el distinguir las lividéces cadavéricas de las hemorragias cutáneas ocurridas todavía durante la vida; como las primeras son producidas por la replección de los capilares, y especialmente de las venitas de la piel y el tejido conjuntivo subcutáneo por la sangre del cadáver que se acumula en las porciones más bajas, región escapular, nalgas y pantorrillas, al incindir la piel la sangre se escapa, en tanto que en las hemorragias la sangre se encuentra retenida en las mallas del conectivo y no se marcha. Esta misma causa hace que el color lívido o azulado de las manchas cadavéricas desaparezca por la presión, cosa que no ocurre en las hemorragias.

Examen interior.— 1. Cabeza.

Apertura. — Si la cabeza tiene pelo abundante (fig. 4), se divide en dos manojos, echando el anterior sobre la cara y dejando colgar el posterior para evitar su corte; empuñando el condrotomo, según hemos indicado, con la mano derecha al mismo tiempo que se sujeta con la izquierda la cabeza, se cortan de una vez la piel, la aponeurosis y el periostio, a partir del vértice de la apófisis mastoides izquierda, continuando por detrás de la oreja, pasando por el vértice y siguiendo por el otro lado del mismo modo hasta llegar al vértice de la mastoides derecha. Debe cuidarse de que la sección no pase por delante del vértice de la cabeza, porque se encuentran después muchas dificultades al tratar de invertir hacia atrás el colgajo posterior, y, en cambio, el que la incisión pase por detrás del vértice puede ser hasta ventajoso, si falta completamente el pelo, para disimular la sutura después de la reconstrucción.

Con el escoplo en T se separa el periostio del hueso (fig. 4), invirtiendo al mismo tiempo el colgajo anterior con la mano izquierda sobre la cara hasta llegar al borde superior de las órbitas; después se hace lo mismo con el posterior hasta llegar

a la protuberancia occipital externa. Examínense las partes blandas y la calota craneal que acaba de ponerse al descubierto.

Despréndanse a continuación las inserciones craneales del músculo temporal y, sujetando la cabeza con la mano izquierda protegida por un paño y utilizando la uña del pulgar para marcar el comienzo del corte, hágase con la herramienta un

Fig. 4.—Movilización de los dos colgajos del cuero cabelludo para poner al descubierto el cráneo.

corte circular del cráneo, que, partiendo de la frente a 1 o 2 centímetros por encima del reborde orbitario, vaya a parar rectamente a 1 centímetro por debajo del vértice de la escama del occipital; acábese la incisión con el escoplo y el martillo. Cuando la calota está movilizada, procurando que haya adaptación perfecta de los dos bordes óseos en la parte poste-

rior (fig. 5), se introduce por la anterior el dedo índice de la mano derecha en forma de gancho, separando la duramadre y estira fuertemente para acabar de desprender ésta, con lo que el hueso queda separado. Si existieran fuertes adherencias entre la duramadre y el hueso, que no se rompieran con una presión moderada, es preferible cortar la dura en todo el borde de la adherencia y no hacer esfuerzos excesivos, que, a más de

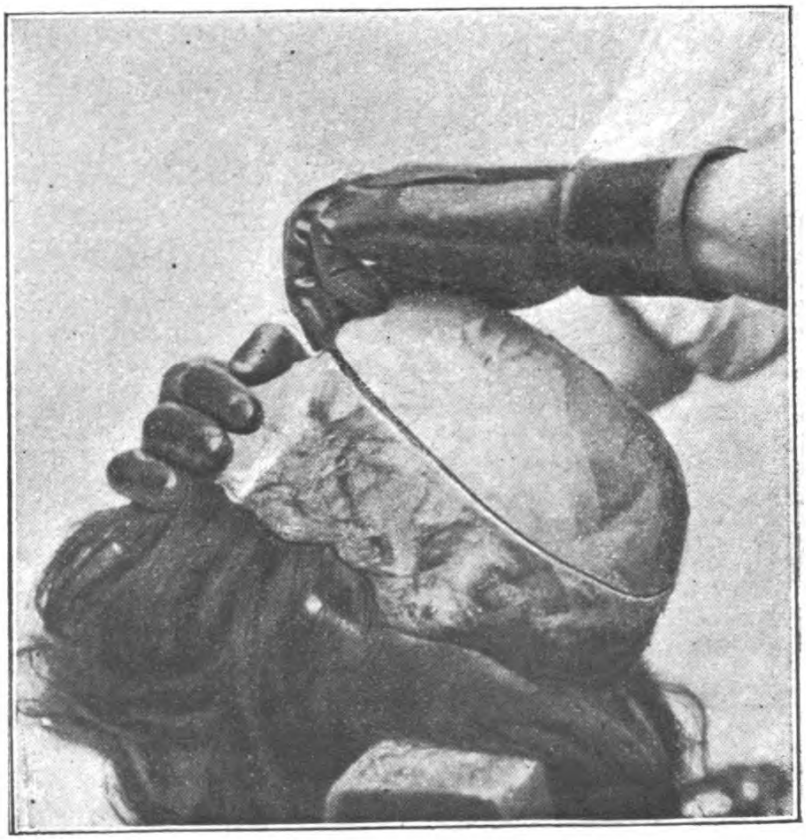


Fig. 5.—Separación de la bóveda craneal.

fatigar, destrozan el cerebro. Cuando las adherencias son muy extensas y fuertes, como ocurre en los niños antes de los siete años, es conveniente seccionar la dura a todo lo largo de la sección ósea, cortar la inserción en la *crista galli* y extraer la dura con el hueso, o serrar a la par el hueso, la dura y el cerebro. Examínese la superficie interior de la bóveda craneal y la exterior de la dura.

Extracción del encéfalo. — Se incinde el seno longitudinal superior en toda su longitud con el cuchillo, observando su contenido y su superficie interior; se corta la duramadre al nivel de la sección ósea en todo el contorno, a partir del polo anterior derecho, cogiendo un pellizco con el pulgar y el índice de la mano izquierda, o con unas pinzas, para tenerla se-

Fig. 6.—Sección de los nervios craneales.

parada del cerebro y evitar la sección de éste, y se invierte cada mitad de la dura seccionada sobre la mitad opuesta para observar la superficie interior; en seguida, al mismo tiempo que la mano izquierda tira hacia atrás y arriba de la parte anterior de la dura para poner tensa la inserción de la hoz en la *crista galli,* con un escalpelo delgado se corta la inserción y, rasgando las demás adherencias de la dura, se la lleva hacia

atrás y se la deja colgar, después de tomar nota de las particularidades que presente.

En este momento se estudia con todo detenimiento la convexidad del cerebro (forma, simetría, dimensiones, color, consistencia, replección vascular, aspecto de la pía madre, surcos y circunvoluciones); a continuación se corre hacia el cuello el zócalo que levanta la cabeza para que cuelgue; se levantan con los dedos de la mano izquierda, en forma de gancho, los polos frontales de ambos hemisferios, seccionando con un escalpelo largo y delgado ambos nervios olfatorios, los ópticos (fig. 6), las carótidas internas, ambos motores oculares comunes y el tallo de la hipófisis; en seguida se cortan las inserciones de la tienda del cerebelo en las apófisis clinoides posteriores y a lo largo de ambos peñascos, sin herir el cerebelo; se introduce el escalpelo por el agujero occipital, paralelamente a la médula, y se seccionan los restantes nervios craneales, primero a la derecha y después a la izquierda, y, finalmente, la médula a la mayor profundidad posible. Para evitar que este último corte resulte oblicuo, Pick aconseja el empleo de un mielotomo, formado por un largo mango, con una pequeña hoja cortante que forma con aquél un ángulo de 100°.

Desde que se corta la tienda del cerebelo, debe aplicarse la palma de la mano izquierda sobre la convexidad de los hemisferios para evitar que la acción de la gravedad destroce el cerebro; y cuando la médula ya ha sido cortada, con la mano derecha se extrae el cerebelo al mismo tiempo que se imprime un movimiento de báscula a todo el encéfalo, que sale fácilmente, quedando sobre la mano izquierda con la base hacia arriba. Depositado el cerebro en esta forma en una bandeja, examínase la base, con sus membranas y vasos, persiguiendo éstos hasta la fosa de Silvio.

Autopsia del encéfalo. — No puede ser el mismo siempre el procedimiento empleado para la autopsia del encéfalo. En la investigación de la existencia de lesiones no diagnosticadas en vida, se somete el encéfalo a un desmenuzamiento tal, que, aun practicado por persona competentísima y con el mayor cuidado, dificulta bastante el examen histológico de las lesiones halladas, e imposibilita o dificulta el estudio de aquellos casos en que la lesión principal radica en el cerebro o,

cuando menos, se presume su existencia. Según este criterio, emplearemos el procedimiento de Virchow cuando tratemos de investigar lesiones no sospechadas, y, en caso contrario, procederemos a los cortes frontales o a la fijación en masa antes de la sección.

1.° *Procedimiento de Virchow.* — Se coloca el cerebro con la convexidad hacia arriba, sobre una plancha de madera, y se procede a separar la pía madre con los vasos, cortándola de delante a atrás en el borde superior de cada hemisferio y arrollándola progresivamente a un lado y otro con los dedos, que la extraerán cuidadosamente de los surcos; si se desgarra, vuélvase a coger con las pinzas en un surco próximo, y continúese hasta dejar limpia toda la corteza. Obsérvese en toda su extensión la firmeza con que se adhiere y si arrastra consigo la corteza; si las adherencias fueran muy resistentes, en vez de destrozar la corteza al pretender deshacerlas, córtese la *pía* en derredor y consérvese la región para el examen histológico.

A continuación se separa moderadamente hacia afuera el hemisferio izquierdo, abrazándolo con la mano izquierda de modo que el pulgar se apoye en la cara interna de aquél, y los demás dedos en la externa, para poner de manifiesto la mitad correspondiente del cuerpo calloso; con el cuchillo se incinde este cuerpo 2 o 3 milímetros por fuera del rafe, entre la *rodilla* y el *esplenio,* sorprendiéndose en este momento parte del *cuerpo estriado,* del *tálamo óptico* y del *plexo coroideo* en el fondo del ventrículo lateral, que no deben ser cortados al incindir el cuerpo calloso; continúese la sección hacia delante y hacia atrás, hasta abrir por completo las prolongaciones frontal y occipital del ventrículo; haciendo una presión más fuerte hacia afuera en el hemisferio izquierdo, sin desgarrar, y con el cuchillo inclinado unos 45°, se rebordea el cuerpo estriado, llegando hasta cerca de la corteza, pero sin completar la sección, a fin de separar los núcleos centrales del hemisferio que se apoya en la mesa; el *centro oval,* con el cuchillo perpendicular a la superficie de la sección anterior, se incinde de delante a atrás en su línea media, y cada una de las mitades que resulten volverán a ser seccionadas del mismo modo, siguiendo el borde en que se unen las dos superficies de sec-

ción, pero teniendo en cuenta en todos estos cortes que, aunque deben ser profundos, no serán nunca completos, debiendo quedar unidos todos los trozos por la corteza de tal manera que puedan superponerse como el varillaje de un abanico.

En el lado derecho se hace lo mismo, después de dar vuelta al cerebro, de modo que el polo frontal mire al operador;

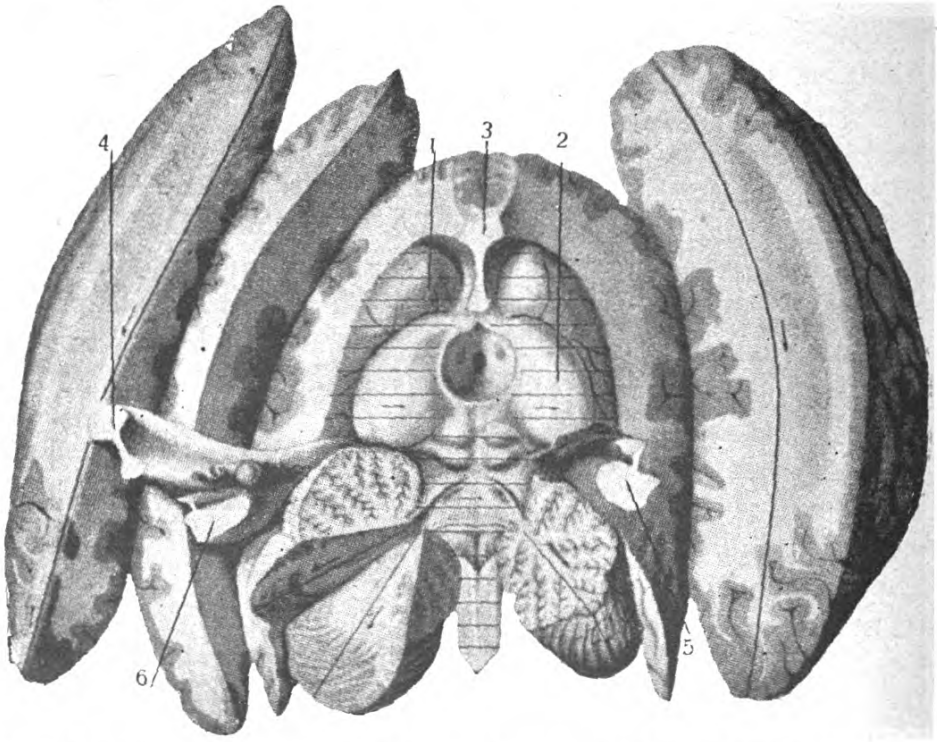


Fig. 7.—Autopsia del cerebro por el procedimiento de Virchow. Aspecto del cerebro seccionado (Nauwerck). Las líneas indicadas por flechas señalan sitio y dirección de las incisiones que deben practicarse todavía.—1, cuerpo estriado; 2, tálamo óptico; 3 y 4, cuerpo calloso; 5 y 6, pilares posteriores del *fornix*.

pero también se puede hacer, aunque con menor comodidad, en la misma posición que tenía anteriormente, cruzando los brazos como los pianistas.

Introduciendo el escalpelo por el *agujero de Monró,* con el filo hacia arriba, se seccionan transversalmente el *cuerpo calloso* y el *fornix,* que se echan hacia atrás para el estudio del ventrículo medio. En seguida los *núcleos centrales* son seccionados transversalmente (fig. 7, *1*), empezando por la cabeza

del cuerpo estriado y terminando por la parte más posterior del tálamo, mediante numerosos cortes que dejan entre sí unos 5 milímetros, cortes que abarcarán todo el espesor de los núcleos correspondientes, sin ser totales.

Córtese el *pilar posterior* derecho del *fornix* y rechácesele hacia la izquierda, en unión de la *pineal* y la *tela coroidea,* para poner al descubierto los *tubérculos cuadrigéminos;* sosteniendo con la mano izquierda la protuberancia y el cerebelo, se incinde de delante a atrás el *vermis,* de manera que el *cerebelo* quede dividido en dos mitades pendientes de los pedúnculos cerebelosos y aparezca el fondo del cuarto ventrículo; se parte cada una de ambas mitades cerebelosas en otras dos, mediante secciones transversales, por el borde de unión de las caras superior e inferior y siguiendo el eje medio del árbol de la vida; cada una de éstas es a su vez partida en otras dos, y cada una de las que resulten en otras dos a modo de abanico, con secciones perpendiculares a la superficie del corte resultante de dividir cada lóbulo por primera vez; finalmente, los tubérculos cuadrigéminos, los pedúnculos, el bulbo y la porción de médula unida divídense transversalmente por cortes distanciados entre sí unos 5 milímetros.

2.° *Procedimiento para la conservación del encéfalo.*—Si la conservación se hace con vistas a la preparación de piezas de museo, lo mejor es fijar el cerebro en su totalidad y después realizar los cortes más a propósito para la demostración; mas si se quiere facilitar el examen microscópico, que exige una rápida e intensa penetración de los fijadores, se practicarán numerosas secciones frontales.

Estas secciones pueden ser hechas en el cerebro entero o después de dividir el encéfalo en tres partes, cortando ambos pedúnculos cerebrales y separando después los dos hemisferios mediante sección antero-posterior en la línea media. En ambos casos pueden ser como los cortes de Pitres, paralelos al surco de Rolando, 5 centímetros por delante de dicho surco, por el pie de las circunvoluciones frontales, por la *frontal ascendente,* por la *parietal ascendente,* por el pie de las *parietales* y, en fin, 1 centímetro por delante de la *fisura parieto-occipital;* pueden ser completamente frontales y, finalmente, horizontales, teniendo en cuenta las particularidades que se pre-

tendan investigar. Claro es que todos estos cortes deben ser practicados con un cerebrotomo humedecido por sus caras para que seccione limpiamente.

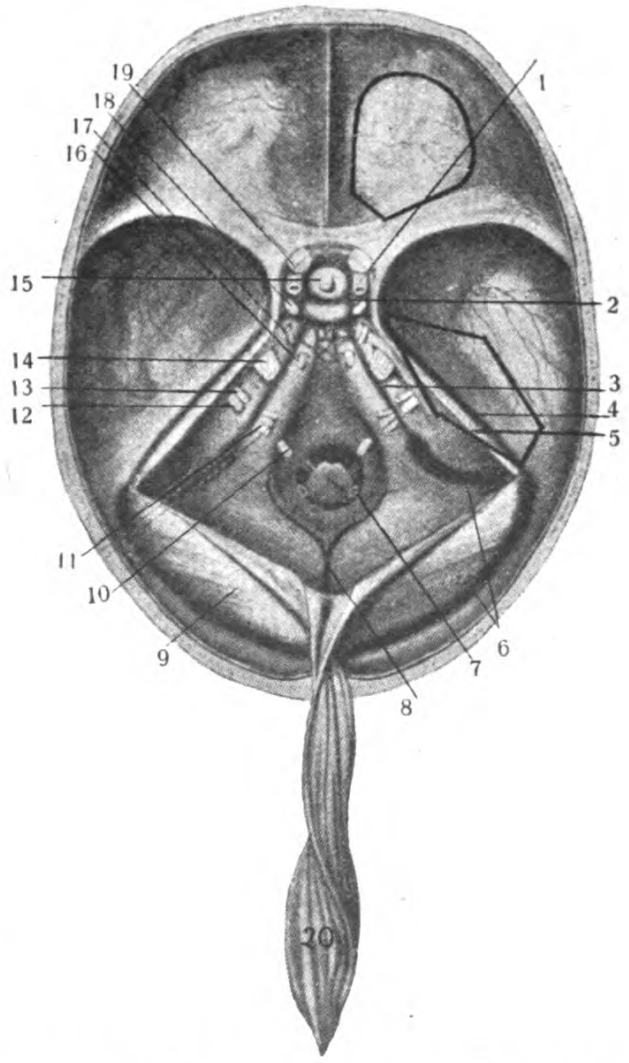


Fig. 8.—Base del cráneo después de extraer el cerebro (Nauwerck). El espacio circunscrito por la gruesa línea anterior indica la parte que hay que levantar para descubrir la cavidad orbitaria. El polígono posterior corresponde a las cavidades auditivas.—1, carótida interna; 2, seno cavernoso; 3, seno petroso inferior; 4, seno petroso superior; 5, línea de sección de la tienda del cerebelo; 6, seno transverso; 7, arteria vertebral; 8, seno occipital; 9, tienda del cerebelo; 10, nervio hipogloso; 11, nervios glosofaríngeo, vago y accesorio; 12, nervio acústico; 13, nervio facial; 14, nervio trigémino; 15, hipófisis; 16, nervio motor ocular externo; 17, ídem interno; 18, ídem común; 19, nervio óptico; 20, meninges.

Estudio de la base del cráneo.—Incíndanse los senos venosos de la *duramadre,* y preferentemente los transversos y cavernosos; con una pinza fuerte, y todavía mejor con las tenazas especiales para esta maniobra, provistas de dientes que sujetan pero no desgarran, sepárese la duramadre de los huesos de la base, explorando éstos detenidamente; secciónese circularmente la dura que cubre la *hipófisis;* despréndase ésta de la *silla turca* por delante y los lados, y extráigase la hipófisis, cortando las apófisis clinoides posteriores con una tijera fuerte o con una cizalla; en fin, sepárese la hipófisis del trozo de hueso, y seccionada transversalmente, nos permitirá juzgar del estado de sus lóbulos.

Con lo dicho quedaría terminada la autopsia del cráneo si, dadas las dificultades de índole social indicadas anteriormente que existen para el estudio de las lesiones de los órganos y cavidades de la cara, no fuera preciso el estudiar estos órganos al través de la base del cráneo. La cavidad que con más frecuencia debe ser abierta es el *oído;* esto se consigue fácilmente, levantando con el escoplo el techo del *oído medio* (fig. 8, polígono de la región petrosa), al lado del abultamiento producido por el *conducto semicircular superior,* en la superficie anterior de la pirámide timpánica; en caso de necesidad, puede ser separado el tímpano por completo para su examen ulterior. La cavidad orbitaria se examina de modo análogo, levantando su techo con el escoplo y el martillo (fig. 8, línea de la región orbitaria), y si fuera imprescindible la extracción de un ojo, se haría por el mismo sitio o por delante, como si tratara de una enucleación quirúrgica, respetando los párpados y la conjuntiva y sustituyéndolo por otro de cristal. Procedimientos semejantes pondrán de manifiesto los senos frontales, etmoidales, maxilares y la cavidad nasal.

CAPÍTULO IV

2. MÉDULA ESPINAL.

La extracción de la *médula* puede hacerse antes que la del cerebro cuando constituye la lesión predominante y ha sido diagnosticada en vida, pero es preferible el verificarla a conti-

nuación de éste. Convendría que fuera realizada sistemáticamente en todas las autopsias, pues en muchas ocasiones compensaría el trabajo de su extracción con los datos que nos suministrara; mas de ordinario no se practica sino en los casos en que se presume su lesión o cuando las perturbaciones encontradas en el cerebro indican la conveniencia de su estudio. También se puede efectuar después de terminar la autopsia, como último tiempo, si bien en este caso la falta de las paredes del tórax y abdomen dificulta la sección del conducto y como es preciso dar vuelta al cadáver, resulta sucia la maniobra por los líquidos que se derraman.

Aunque la extracción puede hacerse también por delante, lo más frecuente es utilizar la cara posterior; para ello se invierte el cadáver, de modo que la parte anterior mire hacia abajo, elevando el cuello y los lomos por medio de zócalos; se incinde la piel con el tejido subcutáneo en la línea media, por encima de las apófisis espinosas, desde la protuberancia occipital externa hasta el sacro; se prepara hacia afuera la piel con la grasa correspondiente, por ambos lados, en una extensión igual a la mano; se practica una incisión profunda a cada lado de las apófisis espinosas, en toda la longitud de la columna, y otra, también bilateral, como a unos 3 o 4 centímetros por fuera de las anteriores, al objeto de cortar las inserciones de los músculos vertebrales; después se separan éstos, de arriba a abajo, echándolos hacia afuera, y en fin, se limpian los canales vertebrales de los restos musculares, que puedan dificultar el funcionamiento de la sierra, por medio de una legra. Acto continuo, se sierran las láminas vertebrales, valiéndonos del *raquitomo* o sierra de dos hojas (fig. 2, *1*), empezando la maniobra por el arco dorsal, con una separación de las hojas de 1 centímetro, de suerte que las apófisis espinosas queden entre ambas hojas y éstas muerdan por dentro de la línea de las apófisis articulares, con movimientos suaves y largos, continuando con la médula lumbar y finalmente con la cervical, para cuya sección convendrá invertir el movimiento, es decir, dirigirlo hacia el occipucio; para la columna lumbar y la cervical habrá que separar más las láminas del instrumento. También pueden emplearse sierras curvas de una sola hoja, pero resultará el trabajo mucho más lento. Se rompen con el escoplo los puentes

óseos que queden, especialmente en la porción cervical, y después de seccionar los ligamentos correspondientes por arriba o por abajo, se agarra fuertemente el colgajo óseo-ligamentoso con una tenaza, y se le separa hacia atrás y afuera, al mismo tiempo que se seccionan las adherencias que resten con la cizalla o las tijeras fuertes, según sea su naturaleza, teniendo cuidado de no alterar ni el saco medular ni la médula.

En los niños y jóvenes, se puede abrir el conducto vertebral cortando las láminas vertebrales sucesivamente a un lado y otro con la cizalla, y en los muy jóvenes con una tijera fuerte.

Después de examinar la cara exterior del saco dural, se incinde éste por su línea media en toda su longitud; se separan ambas mitades y se observa la cara posterior de la médula; con unas pinzas se prende la parte superior de la *dura* y se tira de ella, al mismo tiempo que con unas tijeras se van cortando a un lado y otro todos los pares nerviosos y así como las adherencias de la *dura* por su cara anterior y por los lados, hasta llegar a la cola del caballo, con lo que resulta completamente separada la médula en unión del saco dural. Extendida la médula sobre una tabla apoyada en su cara posterior, se corta la *dura* por su línea media anterior en toda su longitud y se examina su cara interior y la superficie anterior de la médula. Finalmente, si la médula ha de ser examinada histológicamente, puede ser fijada en masa; pero tanto en este caso como si no ha de servir para investigaciones posteriores, es conveniente el seccionarla transversalmente, sin acabar las secciones para que queden unidas y sea posible conocer en todo momento la situación de la porción que interesa en toda su longitud, dejando 1 centímetro entre cada dos cortes y estudiando el aspecto que presentan al ser seccionadas la substancia gris y la blanca.

Cuando no sea precisa la extracción de toda la médula, se extraerá del mismo modo descrito la porción que interese.

CAPÍTULO V

3. Tronco.

Para la apertura de estas cavidades, se hace una incisión que partiendo del mentón y mejor todavía, para que sea fácilmente disimulable, desde el hioides, siguiendo la línea media en casi toda su longitud hasta el púbis, excepto al nivel del ombligo que será respetado, contorneándole por el lado izquierdo, a fin de evitar la sección del ligamento redondo del hígado o la vena umbilical. A la altura del cuello dicha sección comprenderá la piel y el tejido subcutáneo, poniéndola tensa con la mano izquierda cuando los relieves impidan el corte, según ocurre al nivel de la laringe y la fosa supra-esternal; en el tórax, llegará la sección hasta el esternón, y en el vientre comprenderá la piel y el tejido subcutáneo, deteniéndose en el plano muscular. Un poco por debajo del apéndice xifoides (figura 3), al mismo tiempo que la mano izquierda coge un pliegue de la pared para evitar la sección de los órganos profundos, se profundiza la incisión cutánea hasta abrir el peritoneo, viéndose el hígado por debajo; se introducen después por la perforación del peritoneo, los dedos índice y medio de la mano izquierda, con la cara palmar hacia los pies del cadáver y, separándolos a modo de horquilla y levantando con ellos la pared, se continúa el corte profundo de la pared hasta el púbis, seccionando las inserciones pubianas de los músculos por debajo de la piel.

Si se presumiera la presencia de gases libres en la cavidad peritoneal, antes de abrir el peritoneo se disecan a un lado y a otro los bordes de la incisión cutánea, hasta formar una especie de bolsa, que se llena de agua, y al través de ésta se punciona el peritoneo, observando cuidadosamente la salida de burbujas. Si al incindir el peritoneo saliera algún líquido, se recogerá con cápsulas o cazoletas a medida que se abre aquél, procurando que no se pierda nada y reuniéndolo en probetas graduadas para su medida y examen ulterior.

Sujetando fuertemente con la mano izquierda la parte de-

recha de la pared abdominal (fig. 9), se tira de ella hacia afuera, cortando sobre el borde costal, que resulta bien acusado, el peritoneo y el plano muscular, desde el apéndice xifoides hasta la punta de la undécima costilla; separando y arrollando cada vez

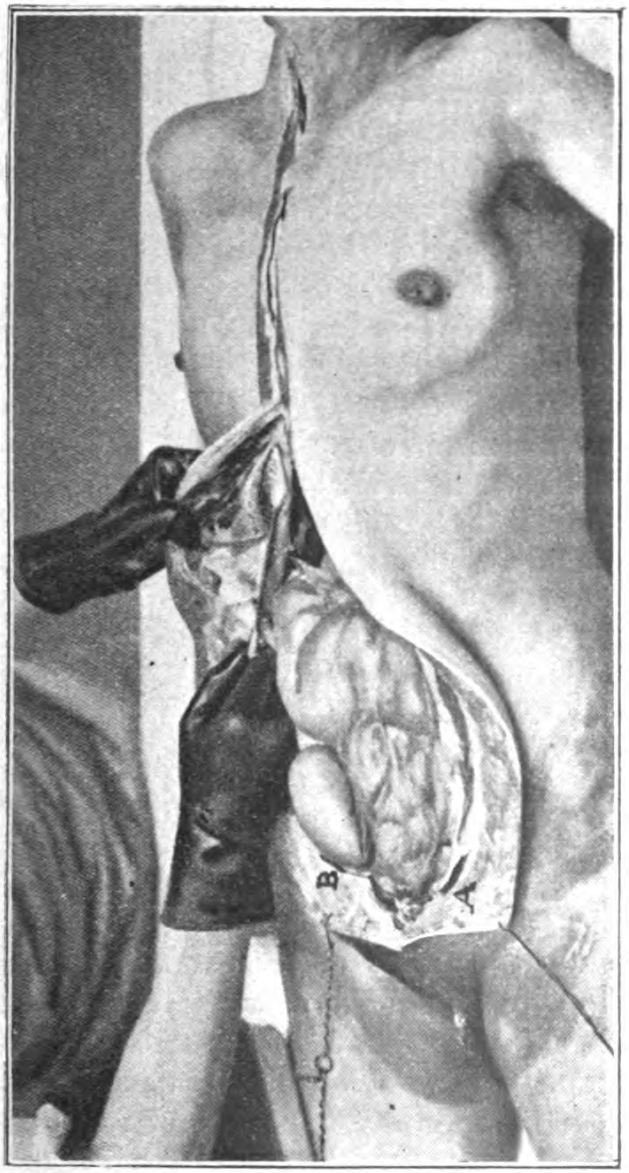


Fig. 9.—Sección de los músculos abdominales al nivel de sus inserciones costales.

más el plano cutáneo-muscular a medida que se libera, se cortan con largos movimientos del cuchillo, inclinado unos 40°, los músculos pectorales, desde el esternón hacia afuera, hasta de-

jar descubiertos los cartílagos costales y unos 5 centímetros de las costillas. En el cuello se continúa la disección del plano cutáneo, pero respetando los músculos y los vasos. En el lado izquierdo se procede de la misma manera, cortando con la mano derecha, mientras que la izquierda, que ha de separar la pared, pasa por encima.

En este momento, y antes de proceder a la apertura del tórax, se observa la altura del diafragma introduciendo la mano derecha por detrás del reborde costal, en la línea mamilar, hasta su punto más alto, al mismo tiempo que la mano izquierda toca los espacios intercostales por su cara externa, anotando el sitio en que se verifica la coincidencia, que debe ser, en casos normales, al nivel de la cuarta costilla en lado izquierdo, y de la quinta en el derecho. Examínese también detenidamente el aspecto, relaciones y magnitudes de los órganos abdominales. La glándula mamaria queda unida al plano cutáneo y puede ser examinada en este momento por su cara profunda, verificando en ella cuantas indagaciones y cortes sean precisos sin perforar la piel. Del mismo modo pueden ser estudiados los ganglios axilares.

CAPÍTULO VI

EXPLORACIÓN DEL PECHO

Apertura. —Cuando tengamos la sospecha de la existencia de aire en alguna de las pleuras, o sea el pneumotórax, procederemos para su averiguación de la misma manera que en el vientre, es decir, formando una bolsa en el punto en que se terminó la disección de la piel, llenándola de agua y perforando la pleura a su través, observando atentamente si se forman burbujas.

Para abrir el tórax se cortan con el condrotomo todos los cartílagos costales, primero en el lado derecho y después en el izquierdo, a $^1/_2$ centímetro por dentro de su unión con la porción ósea de la costilla (fig. 10), empezando con la segunda costilla y terminando con la décima, con objeto de no herir el pul-

món; el condrotomo debe ser mantenido completamente horizontal en su longitud. Si existieran osificaciones, se cortarían con el costotomo, y si, como ocurre algunas veces, estuvieran los cartílagos completamente osificados, al no poder gozar de la ventaja de la falta de esquirlas óseas que puedan herir, ofrecida por las secciones cartilaginosas, la línea de corte de las costillas podría ser llevada más afuera para disponer de más

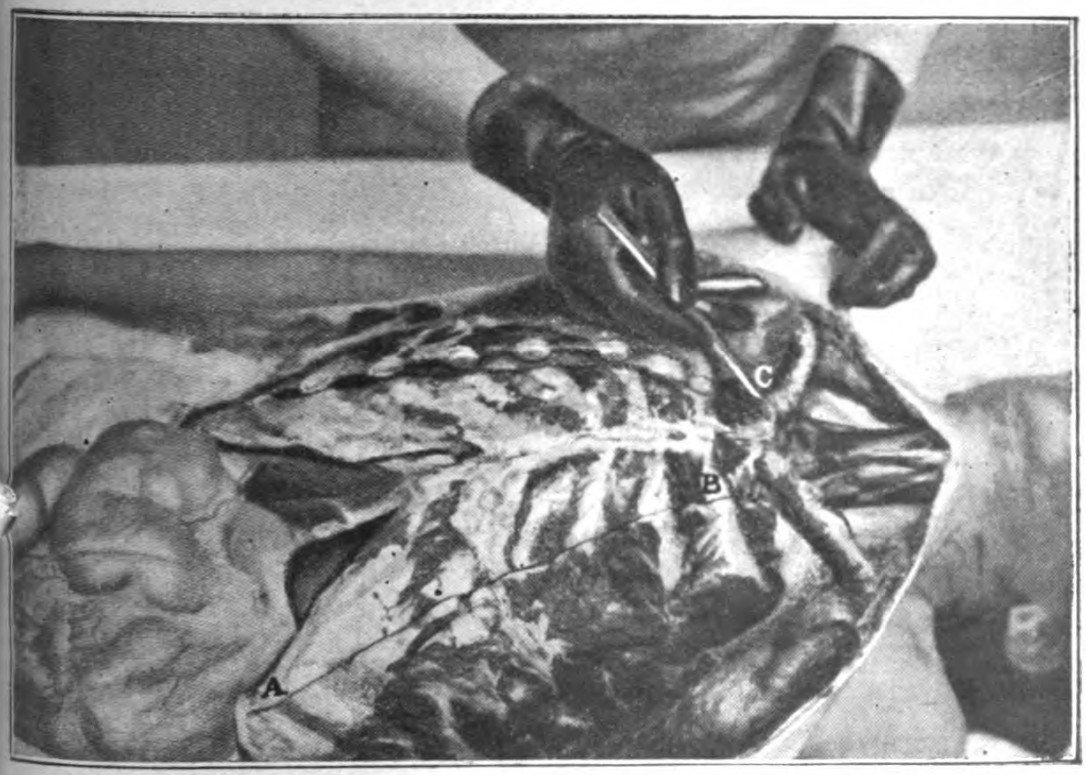


Fig. 10. — Corte de los cartílagos costales y momento último del corte de la articulación esterno-clavicular.

campo y protegerse mejor de los extremos punzantes de los huesos con la misma piel.

Para la sección de la articulación esterno-clavicular empléase un bisturí estrecho y largo, siendo muy a propósito un escalpelo que haya quedado muy reducido en su hoja a fuerza de pasarle por la piedra; teniéndole bien vertical se aplica la hoja de plano, con el corte hacia la línea media, sobre la cabeza de la clavícula derecha; se dirige hacia adentro, contor-

neándola, y se cae sobre la línea interarticular; se secciona suavemente, dirigiendo el filo hacia atrás, pero manteniendo el escalpelo vertical; cuando se va a llegar al extremo inferior se dirige el mango del escalpelo hacia la cabeza del cadáver, para que la punta, basculando en sentido contrario, salve el saliente que muestra la cabeza clavicular entre sus caras interna e inferior; una vez salvado, se vuelve a poner vertical el escalpelo, se dirige el corte hacia afuera, se secciona el ligamento costo-clavicular, y en seguida, a medida que el escalpelo camina separándose de la línea media, se dirige el mango hacia los pies del cadáver (fig. 10, C) para que la punta se introduzca entre la clavícula y la primera costilla, terminando por tenderlo por completo para seccionar el subclavio y liberar la clavícula, que se levanta progresivamente con la mano izquierda. Después se corta el primer cartílago costal, que es más largo que el segundo. En el lado izquierdo se procede de la misma manera.

Se acaba de separar la pared torácica anterior tirando de su borde inferior hacia arriba, al mismo tiempo que con el cuchillo se cortan las inserciones del diafragma de izquierda a derecha, junto a la misma pared, para evitar la lesión de los órganos torácicos; a continuación se levanta con fuerza la pared, basculando al mismo tiempo la base hacia la cabeza, y se la acaba de desprender, no quedando unida al cadáver más que por las inserciones esternales de los esterno-cleido-mastoideos y los esterno-hioideos y tiroideos que se cortan al nivel de su inserción.

Timo. — En este momento se puede estudiar el timo y extraerle para investigaciones posteriores o dejarle *in situ* para sacarle con los órganos del cuello.

Corazón. — Se coge un pellizco del pericardio con la mano izquierda o con unas pinzas para separarlo del corazón, y con el cuchillo se perfora en la mitad de su línea media, continuando después la incisión hacia arriba hasta su reflexión en los grandes vasos, y hacia abajo hasta el diafragma; en este punto se bifurca la incisión, siguiéndola a la derecha paralelamente al diafragma, y la izquierda en busca de la punta del corazón hasta la total apertura del pericardio. Si al verificar la perforación saliera líquido pericardíaco, se recogerá cuida-

dosamente, como dijimos, en la cavidad peritoneal, y debe ser practicado en todas las cavidades; en caso contrario, una vez abierto del todo el pericardio, levántese el corazón y se verá recogido todo el líquido en el fondo de la cavidad.

Después del examen detenido de la superficie del pericardio y cuantos caracteres hemos dicho que es preciso tener en cuenta en el estudio de la totalidad de cada uno de los órganos que forman el cuerpo humano, forma, volumen, dimensiones,

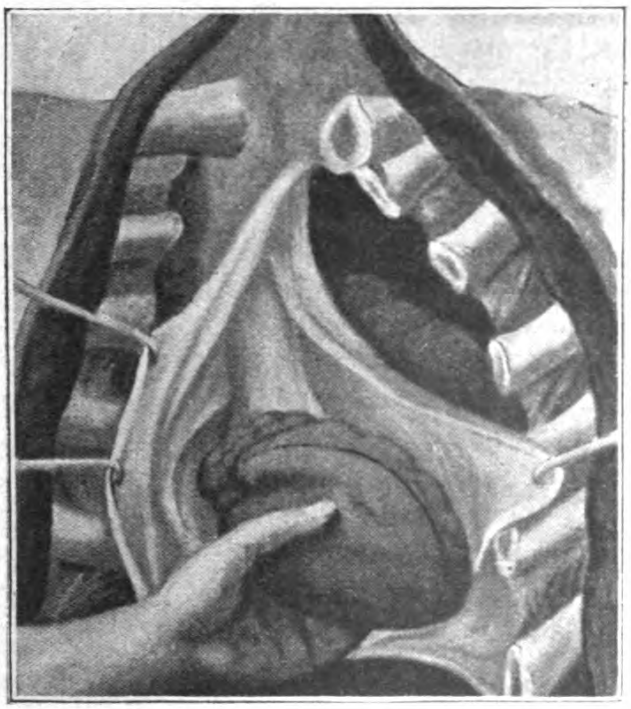


Fig. 11. — Posición y línea indicadora para la apertura de las cavidades derechas.

color, consistencia y cantidad de sangre que rellena sus vasos, procederemos a su apertura para la investigación de sus cavidades, antes de separar el corazón del cadáver. Las cuatro cavidades del corazón son abiertas por el borde correspondiente, es decir, las dos derechas por el borde derecho, y las dos izquierdas por el del mismo lado, sujetando el corazón de manera que el borde que se trata de seccionar resulte bien manifiesto. Para ello se coloca la mano izquierda por detrás del co-

razón, de modo que abrace su cara posterior y sus dedos contorneen el borde izquierdo, asomando en la cara anterior al mismo tiempo que el pulgar se apoya por detrás en el borde derecho, haciendo girar el órgano para que al mismo tiempo que se acusa notablemente el borde derecho, éste se coloque en situación algo anterior, y elevando el borde externo de la mano izquierda, aparece una gran parte de la aurícula del mismo lado; en esta posición (fig. 11), con el cuchillo se hace un corte en la pared de la aurícula, siguiendo la dirección del borde desde la inserción del pericardio hasta el surco aurículo-ventricular, casi equidistante de ambas cavas, y, sin abandonar dicha posición, se secciona el borde del ventrículo en la misma dirección. En seguida se introducen el índice y el medio de la mano izquierda por las aberturas para averiguar el contenido de dichas cavidades, la amplitud del orificio aurículo-ventricular y el estado de la tricúspide. Después se coloca la palma de la mano izquierda sobre la punta, de modo que sus dedos se apliquen sobre la cara anterior y el pulgar sobre la posterior, y, sujetando bien el corazón, se tira de él hacia la derecha, al mismo tiempo que se le hace girar de modo que su borde izquierdo se marque y resulte anterior; colocado de esta manera, siguiendo la dirección de dicho borde (fig. 12), se corta primero la pared de la aurícula sobre la vena pulmonar izquierda superior hasta llegar al surco aurículo-ventricular, y después, en la misma dirección, el borde del ventrículo. A continuación se introducen los dedos índice y medio de la mano derecha por ambas aberturas, estudiando el contenido de las cavidades correspondientes, la magnitud del orificio y el estado de la válvula mitral.

Estos reconocimientos deben ser practicados con extraordinaria precaución, pues en caso contrario, nos exponemos a destruir datos necrópsicos de interés, que sólo se perciben bien cuando se abre por completo la cavidad, así es, que en los casos en que se sospecha la existencia de endocarditis, trombus, etcétera, será mejor el dejar tales comprobaciones para después, y quizás fuera preferible prescindir constantemente de ellos, ya que aun después de cortados los orificios se puede juzgar muy bien de su magnitud.

Introduciendo el pulgar de la mano izquierda por el corte

hecho en el borde del ventrículo derecho y el índice de la misma mano por la incisión de ventrículo izquierdo, se coge la punta del corazón y se tira de ella fuertemente hacia arriba para descubrir todos los vasos de la base y cortarlos por largos cortes del cuchillo, cerca de la inserción del pericardio en el siguiente orden: vena cava inferior, venas pulmonares inferiores y superiores, arterias pulmonar y aorta, y vena cava superior, con lo que el corazón queda libre.

Fig. 12. — Posición y línea indicadora para la apertura de las cavidades izquierdas.

Para probar la perfección con que cierran las válvulas arteriales, se quitan los coágulos que se han formado en los orificios correspondientes, con precaución, y sosteniendo el corazón con la mano izquierda o sosteniéndole un ayudante por las orejuelas, se vierte agua por la arteria que provocará la oclusión de la válvula y quedará contenida. Si no hubiera retención perfecta, se volverá a repetir la prueba, después de cortar la arteria paralelamente al orificio, de modo que se vea directa-

mente el funcionamiento de las válvulas. También se puede hacer la prueba introduciendo el corazón en una vasija con agua y sacándolo rápidamente.

Depositado el corazón en una tabla, en su posición normal, es decir, con su cara anterior hacia arriba, se completan los cortes para la inspección de las cavidades del siguiente modo: se levanta con la mano izquierda la incisión del borde ventri-

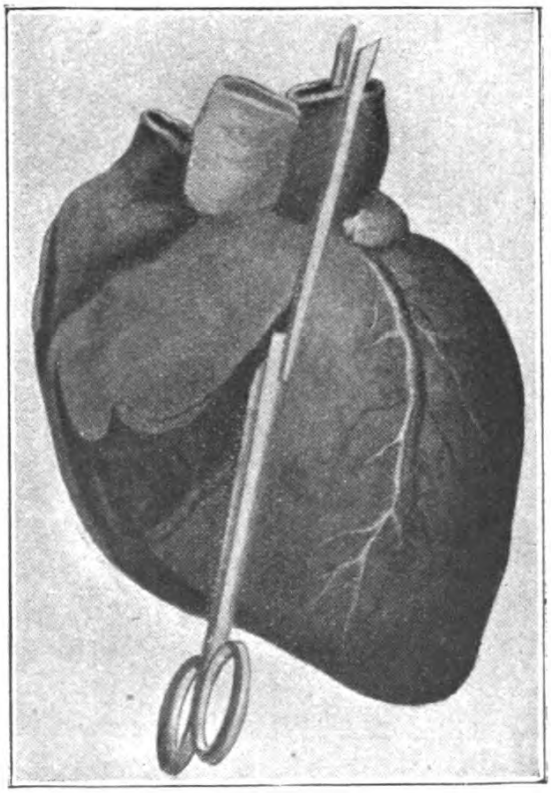


Fig. 13.—Apertura del ventrículo derecho.

cular derecho y mirando se introduce la hoja larga del enterotomo por entre la pared anterior del ventrículo y el músculo papilar anterior, para evitar que éste quede cortado; cuando sale el gancho del instrumento por la arteria pulmonar (fig. 13), se coloca dicha hoja de modo que sea paralela a la base del corazón y pase tocando a la grasa existente en el comienzo del surco interventricular y se corta toda la pared anterior del corazón y la arteria pulmonar, pudiendo examinar la cavidad ven-

tricular de la tricúspide, la válvula de la arteria pulmonar que quedará cortada entre la valva anterior y la posterior derecha, y la superficie interior de la arteria. A continuación se introduce la hoja larga del enterotomo por la incisión auricular y sacándola por la ventricular se corta el puente que las separa, con la válvula tricúspide, que ahora puede ser detenidamente examinada, así como el interior de la aurícula.

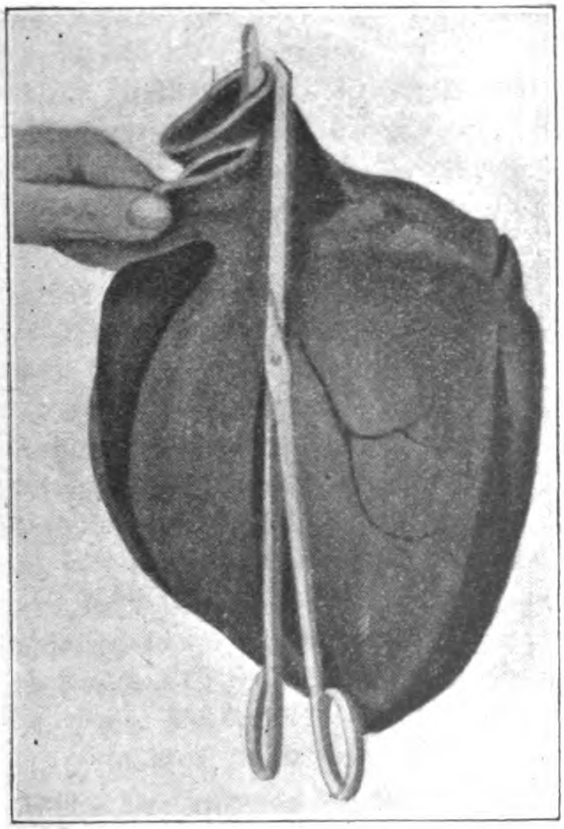


Fig. 14.—Apertura del ventrículo izquierdo.

Para abrir el ventrículo izquierdo, se introduce el instrumento por la incisión ventricular en su parte más próxima a la punta del corazón y siguiendo el cono arterial, se corta la pared anterior del ventrículo paralelamente y lo más próximo que sea posible al surco interventricular hasta su mitad o poco más; en este momento se cambia de dirección, se saca la tijera por la aorta y se corta lo que resta de la cara anterior y la

aorta, haciendo que pase el corte entre la arteria pulmonar, de la que se tira hacia la izquierda y la orejuela (fig. 14). Obsérvese la cavidad ventricular, la superficie correspondiente de la mitral, el cono arterial y la válvula aórtica. En seguida se introduce la tijera por la abertura auricular y sacándola por la ventricular, se corta el puente que la separaba, pudiéndose estudiar la cara auricular de la válvula mitral y la superficie interior de la aorta.

Para el estudio de la coronaria izquierda se busca la desembocadura en la aorta por encima de la válvula, próxima a la sección, y con las tijeras medianas o finas, según sea su calibre, se incinde a lo largo del surco anterior del corazón, al mismo tiempo que se estudia su contenido y el aspecto de su pared; para la derecha se procede de modo análogo, buscando la arteria en la grasa que rellena el surco aurículo-ventricular derecho, en la sección del borde derecho, y siguiéndola a lo largo de este surco hasta su entrada en la aorta.

Examínense detenidamente las secciones practicadas en el miocardio y practíquense nuevos cortes en distintos puntos para investigar la posible existencia de lesiones. Si se sospecha la presencia de una embolia pulmonar, debe verificarse la apertura de la arteria pulmonar *in situ,* es decir, antes de extraer el corazón. En caso de aneurisma de la aorta, se practican todos los cortes del corazón *in situ,* y el corazón se extrae al mismo tiempo que la aorta y después de separar los pulmones. Finalmente, si se sospecha la existencia de una embolia gaseosa, se indagará al comienzo de la autopsia del tórax, sin acabar de desprender su pared anterior, a fin de que la sección de los vasos mamarios o la de los grandes vasos del cuello no puedan inducir a error; se llena de agua, se levanta vasculando, se incinde el pericardio y se punciona el ventrículo derecho, observando si se desprenden burbujas.

Pulmones. — Si se comprobó, como hemos indicado antes, la presencia de aire en la pleura, y es preciso averiguar el sitio donde se encuentra la perforación de la pleura, se introduce por la tráquea un tubo para la insuflación provisto de llave, y después de ligar, se insufla aire, se cierra la llave y se examina por medio del agua el sitio por donde salen las burbujas.

Se coge el lóbulo superior del pulmón izquierdo con la mano

izquierda; se le conduce hacia abajo y adelante, al mismo tiempo que la mano derecha; utilizando el borde, despega las posibles adherencias, y cuando aparece bien al descubierto el hílio, se le secciona, cuidando de no lesionar el esófago; continuando la maniobra, se acaba de extraer el pulmón. Si las adherencias no pudieran ser rotas por la mano, se seccionará la pleura en todo su contorno, y en caso de ser demasiado intensas, se despega la pleura costal y se extrae adherida al pulmón. A continuación se coloca el pulmón sobre una tabla, con la base hacia el operador y el hílio hacia abajo, y después de estudiar la totalidad del órgano y juzgar por presiones moderadas de su consistencia, elasticidad y contenido, apoyando la mano izquierda sobre su superficie, de modo que el índice sujete el surco interlobular, el pulgar el lóbulo inferior y los otros tres dedos el lóbulo superior, se le secciona con el gran cuchillo, siguiendo la parte más prominente desde el vértice hasta la base, y orientando el plano del corte de tal manera que llegue a la cara interna al nivel del hílio. Con la tijera mediana se abren los bronquios y vasos pulmonares, desde los más gruesos a los finos, estudiando su contenido y caracteres.

Con el pulmón derecho se procede de la misma manera en su extracción; la sección puede ser hecha de dos modos distintos, o se coloca sobre la tabla con el hílio hacia abajo, pero con el vértice hacia el operador, y procediendo en todo lo demás como en el izquierdo se le corta de base a vértice, o se le sujeta con la mano izquierda como si fuera un bloque, y apoyándole fuertemente sobre la base y con el vértice en el aire, se le corta de vértice a base.

Órganos del cuello. — Cuando se sospeche que los vasos y nervios del cuello presenten lesiones de importancia, debe practicarse su disección y estudio antes de extraer los órganos del cuello, aislando y seccionando a lo largo dichos órganos. Si no hay indicación especial para esta preferencia, se diseca la piel a un lado y otro, de modo que se descubra bien hasta el ángulo de la mandíbula, teniendo buen cuidado de no perforar la piel; se introduce un escalpelo largo y estrecho por detrás de la rama izquierda del maxilar inferior, cerca de la línea media, siempre en contacto con el hueso y con el filo dirigido hacia afuera; con firmes movimientos de vaivén se cortan todos

los tejidos del suelo de la boca, evitando el seccionar la lengua, desde el sitio de entrada del escalpelo hasta el ángulo del maxilar; se repite la maniobra en el otro lado y, finalmente, se cortan los músculos genioglosos; se introducen los dedos de la mano izquierda por la abertura practicada y se tira de la lengua hacia abajo, sacándola; mirando se separa el paladar membranoso del óseo; se corta igualmente la faringe en la unión de sus porciones laríngea y nasal de derecha a izquierda, perpendicularmente a los cuerpos de las vértebras cervicales, y tirando alternativamente de la faringe hacia la izquierda y la derecha, se va disecando el laxo conectivo retro-faríngeo y retro-esofágico, hasta llegar a la entrada del tórax; en este momento se dan dos largos cortes a un lado y otro, de arriba a abajo, para seccionar los órganos que se dirigen a ambos brazos, y después se continúa la fácil separación del esófago, hasta cerca del diafragma, donde se corta transversalmente por encima de una ligadura.

Los órganos que acaban de ser extraídos se colocan sobre la tabla, con la punta de la lengua dirigida hacia el operador y con su superficie hacia arriba, de manera que quede encima el tubo digestivo; con los dedos o con unas pinzas se levanta el arco formado por el paladar membranoso y se le secciona en el lado izquierdo, junto a la úvula; se introduce la hoja larga del enterotomo por la faringe y el esófago, cortando la pared posterior de ambos órganos por su línea media, estudiando al mismo tiempo la sección y la superficie interior; con el mismo instrumento y del mismo modo se corta la pared posterior de la laringe y tráquea, también en su línea media, con lo cual queda seccionado el esófago en dos mitades a todo lo largo, terminando el corte en el bronquio derecho; después se corta el bronquio izquierdo. Si hubiera interés en no seccionar el esófago, se tira de él con la mano izquierda hacia el lado izquierdo del operador, disecándole ligeramente para que no sea cogido por la tijera. Separando las dos mitades de la laringe y tráquea se puede estudiar perfectamente su interior.

Invirtiendo el paquete de órganos para que se apoye sobre el tubo digestivo, se estudian los vasos y nervios, se corta la aorta, se seccionan los lóbulos del tiroides a lo largo, se cortan las glándulas submaxilares y sublinguales y se estudian dete-

nidamente los ganglios y vías linfáticas. Finalmente, se examina el plano muscular y el estado de las vértebras.

En caso de encontrarse lesiones que aconsejaran no seccionar los bronquios, se aislarían los órganos del cuello del modo indicado antes de extraer los pulmones y se sacarían unidos estos órganos.

CAPÍTULO VII

EXAMEN DEL ABDOMEN

Como hace observar Nauwerck, la autopsia del *abdomen,* que en casos poco anormales resulta de gran sencillez, cuando existen adherencias entre sus distintas vísceras se dificulta notablemente, y en ocasiones puede resultar imposible una separación metódica. Si las adherencias no son muy resistentes, sepárense mediante una disección roma, verificada de preferencia con la mano, o córtense si no son separables; pero si las adherencias son tan extensas que, como ocurre a veces, reunen todas las vísceras en un solo bloque, extráiganse juntas y aíslense los órganos fuera del cadáver, y por último, si esto también resultara imposible, se divide la masa en distintas direcciones con el cuchillo, estudiando en estas secciones los distintos órganos.

Si se sospecha la existencia de alguna perforación, póngase de manifiesto de modo semejante a como se dijo de la perforación pulmonar. Si se encuentra alguna peritonitis, comiéncese por el órgano que la haya motivado, apéndice, etc.

En la autopsia del abdomen es conveniente tener en cuenta más especialmente algunas de las reglas generales de la autopsia, pues en ella encuentran aplicación con más frecuencia; así, por ejemplo, es muy frecuente entre los cirujanos la práctica de autopsias parciales utilizando las mismas heridas operatorias; pues bien, según puso de manifiesto Fischer, el anatomo-patólogo debe respetar todas estas lesiones operatorias, como las cicatrices y cuerpos extraños, extrayéndolas en unión de los órganos con que se hallan adheridos, porque sola-

mente de este modo se podrá obtener una idea del proceso cicatricial, se podrán recoger observaciones interesantes al clínico respecto a la perfección de las suturas, permeabilidad de los conductos, situación de los órganos y otros muchos datos. La presencia en el peritoneo del contenido intestinal será demostración palmaria de la existensia de una perforación, o de la incontinencia de una sutura, siempre que se haya tenido precaución para no producir una abertura con el cuchillo en el momento de seccionar la pared del vientre y se observe antes de someter las vísceras intestinales a maniobras que puedan determinar la rotura de flojas adherencias con salida del contenido en aquel momento; en caso de duda, los fenómenos reactivos de la mucosa nos ayudarán a resolver. Respecto a la peritonitis, cuando existe pus en el peritoneo y se han formado pseudomembranas, no ofrece dudas; pero no ocurre lo mismo si se encuentra en sus primeros momentos y no se hace perceptible por la sequedad y pérdida del brillo natural de la serosa; entonces será conveniente el raspar ligeramente con el filo del cuchillo la superficie de un asa intestinal y examinar al microscopio en busca de glóbulos de pus y de microbios.

Epiplón mayor. — Cogiéndole por su borde libre inferior se le atrae hacia arriba y, después de observarle detenidamente, se le secciona al nivel de su inserción en el colon transverso.

Bazo. — Con la mano derecha se tira del estómago hacia el lado derecho, para hacer más accesible el bazo, y con la izquierda se tira del órgano, destruyendo las flojas adherencias de la cápsula; cuando sólo queda unido por los vasos esplénicos en el hílio, después de estudiarlos, son seccionados cuidadosamente mirando, y se extrae el bazo, que se coloca sobre la tabla con el hílio hacia abajo, y se corta por el medio de su cara convexa hasta llegar al hílio. Si las adherencias de la cápsula son fuertes, córtense, pues se corre el riesgo de desgarrar el bazo, que, por regla general, es bastante friable.

Intestino (extracción). — En el procedimiento de Virchow la extracción y estudio del intestino quedaba para lo último, con objeto de que el operador no se viera molestado con malos olores y suciedades; pero en cambio le dificultaba la maniobra en todo momento el paquete intestinal, que tenía que llevar

constantemente de un lado a otro para estudiar y extraer los órganos colocados por detrás. Nosotros aconsejamos el procedimiento empleado en la actualidad por la mayor parte de los anatomo-patólogos, que consiste en extraer el intestino en

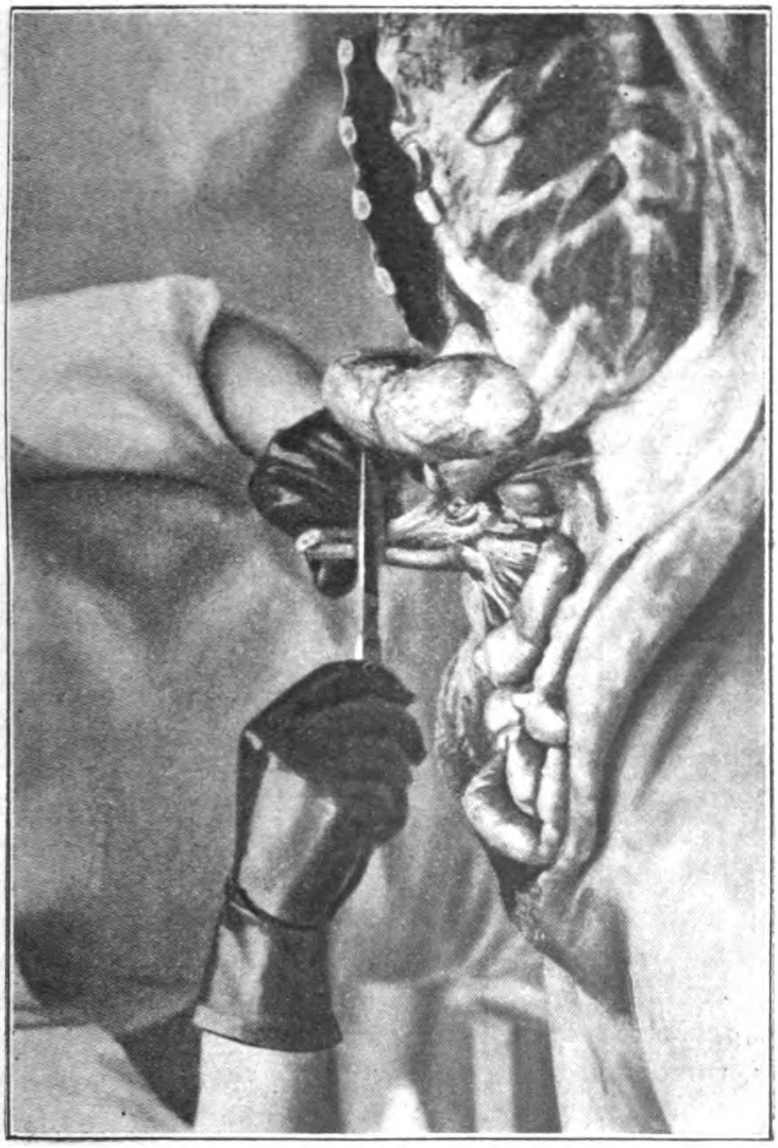


Fig. 15.—Separación del intestino.

este momento y dejarlo en una bandeja hasta la terminación de la autopsia, para abrirlo y estudiarlo.

El *colon transverso,* con su *mesocolon,* se echa hacia arriba, y el intestino delgado hacia la derecha, para que se vea

con claridad el punto por donde el yeyuno se introduce por debajo del mesenterio, a la izquierda de la segunda vértebra lumbar; se hacen dos ligaduras, y por entre ellas se corta el intestino; se coge con la mano izquierda el extremo ligado del yeyuno y, esgrimiendo el cuchillo como el arco de un violín (figura 15), se va seccionando la inserción del mesenterio en el intestino; a medida que se va extrayendo el intestino, se le deposita en una bandeja; al llegar al ciego, se tira de él hacia la izquierda para cortar el peritoneo, que se ha puesto tirante en el lado derecho, de arriba a abajo y después en la base; tirando del colon ascendente, se corta su peritoneo a la izquierda, después el conectivo retrocólico y el peritoneo a la derecha; se libera la flexura hepática, teniendo cuidado de no herir el duodeno; se corta el mesocolon transverso al nivel de su inserción intestinal; se libera la flexura esplénica; se secciona el peritoneo del colon descendente de modo semejante a como se hizo con el ascendente; se corta el mesocolon de la flexura sigmoidea en su inserción intestinal; finalmente, separando ésta del recto entre dos ligaduras, tendremos completamente libre y en la bandeja todo el intestino, salvo el duodeno y el recto, donde quedará hasta el final.

Riñones. — De no existir indicación en contrario se extraen conjuntamente la cápsula suprarrenal y el riñón correspondiente, comenzando por el lado izquierdo. Para ello se levanta el estómago, dirigiéndolo al mismo tiempo algo hacia la izquierda, en unión de la cola del páncreas, para que se vea por completo la cápsula suprarrenal izquierda, profundamente situada en íntimo contacto con la columna vertebral, se aisla la cápsula, contorneándola con el cuchillo por sus bordes superior, interno e inferior, respetando el externo, por el cual se apoya sobre el riñón, y seccionando en su borde interno la vena suprarrenal; se da un corte sagital entre el riñón y la columna vertebral, que comprende los vasos renales después de estudiarlos y se circunscribe seccionando el riñón por fuera y por debajo; se coge el órgano con la mano izquierda, y al mismo tiempo que se tira de él se van seccionando las flojas adherencias, hasta que no quede sujeto más que por el uréter, que es seguido hasta cerca de la pelvis y allí seccionado.

Se coloca el riñón aislado sobre la mano izquierda, de modo

que el hílio se apoye sobre la palma, el pulgar sujete una de las caras y los demás dedos la otra, y con el cuchillo se hace el corte de la cápsula del riñón, siguiendo el centro del borde convexo desde un polo al otro; en seguida con los dedos o con unas pinzas se desprende la cápsula en toda la superficie del riñón, hasta reunirla toda en el hílio, estudiando de paso el grado de su adherencia y el aspecto de su superficie interior; a continuación, con el órgano sujeto siempre del mismo modo, se divide en dos mitades, desde la convexidad hasta la concavidad, para estudiar su textura y acabar observando el interior de sus cavidades excretorias, incluso el uréter, que es cortado a lo largo.

Para el estudio de la cápsula suprarrenal, se corta ésta transversalmente. De la misma manera se procede con el riñón y la cápsula suprarrenal derecha. Cuando convenga extraer los riñones en unión de los órganos pelvianos se aislan los riñones y cápsulas suprarrenales, según se acaba de indicar, y sin cortar los uréteres se dejan los riñones en la mesa al lado correspondiente del cadáver, en tanto que se extraen los órganos pelvianos, como vamos a decir a continuación.

Órganos pelvianos. — Si la vejiga está llena de orina, se debe vaciar para evitar su rotura posterior, introduciendo una sonda engrasada por la uretra o haciendo un pequeño orificio en la parte más alta de su cara anterior en su línea media, es decir, como si fuera el comienzo de la incisión que hemos de hacer después para estudiar el interior. Obsérvese la cantidad de orina que sale y sus caracteres.

A continuación se sujeta con la mano izquierda la vejiga, tirando de ella hacia la cabeza del cadáver y con la mano derecha se rompen las adherencias de su cara anterior al conjuntivo retropubiano, hasta llegar al borde anterior de la próstata; al mismo tiempo se van aislando todos los órganos de las paredes laterales y posterior, hasta que estén completamente separados por todas partes y fijos solamente en el suelo de la pelvis. En este estado se abrazan fuertemente con la mano izquierda, y tirando de ellos hacia la cabeza con escalpelo largo y delgado, se corta la uretra por delante de la próstata, el recto por encima de su esfínter interno, y si se trata de un cadáver de mujer, la vagina por su mitad; a medida que se van

practicando estos cortes, se levantan los órganos correspondientes y se termina por extraerlos cuando las últimas adherencias por detrás del recto han sido cortadas. En los cadáveres de mujeres téngase especial cuidado en que los ovarios y ligamentos no sean falsamente cortados o destrozados.

En la apertura de los distintos órganos pelvianos, que han sido extraídos conjuntamente, se procede algo distintamente, según se trate de órganos masculinos o femeninos. Si el cadáver es de hombre, se colocan los órganos sobre la tabla apoyados en el recto o sea con la vejiga de la orina hacia arriba y la sección inferior hacia el operador; se introduce la hoja abotonada de la tijera por la sección de la uretra y se corta toda la cara anterior de la vejiga en su línea media; se separan las dos mitades, se estudia el estado de la mucosa, el desarrollo de la capa muscular, etc.; en seguida se introduce el estilete por la desembocadura de los uréteres para comprobar su permeabilidad. A continuación se da vuelta a los órganos colocándolos sobre la tabla, apoyados sobre la vejiga e introduciendo la hoja larga del enterotomo por la abertura inferior del recto, se secciona su cara posterior a lo largo de su línea media, estudiando su contenido y pared. Por último, tomando los órganos con la mano izquierda y disponiéndolos de modo que la sección interior de la próstata se apoye sobre la mano, cayendo el recto por un lado y la vejiga hacia el opuesto, para que se distienda el fondo del saco recto-vesical, se ponen de manifiesto las vesículas seminales y los conductos eyaculadores, seccionando transversalmente el peritoneo a su nivel. La próstata se estudia mediante cortes transversales.

Si el cadáver es de mujer, se colocan los órganos y se abre la vejiga de la misma manera que en el hombre; después se introduce la hoja abotonada de la tijera por la vagina y se corta su pared anterior por la línea media; se continúa hacia adelante, penetrando en la matriz y seccionando hasta el fondo, en donde se bifurca la línea del corte en dos, que como las ramas de una Y se dirijan hacia la desembocadura de las trompas; a continuación se penetra en éstas, cortándolas en toda su longitud, y por último, los ovarios son partidos en el sentido de su longitud. Después se da vuelta a los órganos y se corta el recto como en el hombre. Claro es que siguiendo esta técnica

la vejiga es dividida en dos mitades al seccionar la vagina y el útero; pero si fuera conveniente el que esto no ocurra, se tira de la vejiga hacia la izquierda, al mismo tiempo que se cortan los genitales para que el corte no comprenda la vejiga.

Teniendo siempre como norma el respetar lo posible el exterior del cadáver, el estudio de los testículos deberá hacerse extrayéndolos por el propio conducto inguinal; para ello basta dilatar con el cuchillo el orificio interno por debajo de la piel, y después se continúa la dilatación con los dedos hasta llegar hasta la bolsa; en seguida se coge el testículo con los dedos y se le extrae; una vez observado en conjunto o sea envuelto en la vaginal para ponerle al descubierto, se incinde aquélla sujetando el órgano con los dedos índice y pulgar de la mano izquierda, haciendo la sección con precaución para evitar que sea proyectado el líquido contenido en la vaginal; al través de la incisión se saca el testículo. Para estudiar su textura, se le corta en dos mitades siguiendo su diámetro mayor, pero si se sospecha la existencia de alguna lesión que deba ser examinada al microscopio, será conveniente que los cortes sean transversales.

Cuando se necesite estudiar el pene, se prolonga la incisión de la pared del vientre hasta la raíz del pene, con los dedos se le separa progresivamente de la piel y se le extrae después de seccionarle transversalmente en la proximidad del glande, para que éste quede unido a la piel y parezca que no ha sido separado el órgano después de la reconstrucción; en seguida se desprenden sus inserciones pubianas y se diseca cuidadosamente la uretra membranosa para obtener el órgano unido a la próstata si así conviniera.

No tenemos que decir que en caso de necesidad pueden extraerse conjuntamente todos los órganos genito-urinarios, con sólo librarlos de sus adherencias del modo descrito para cada uno de ellos, sacándolos todos a la par de los órganos pelvianos.

Duodeno, estómago, hígado y páncreas. — Rechazando el hígado hacia el tórax, cosa fácil en este momento, queda perfectamente visible su cara inferior, así como el duodeno y el estómago. Cogiendo un pellizco en la mitad de la cara anterior de la porción descendente del duodeno, se hace en este punto una

pequeña incisión por la que se introduce la rama larga del enterotomo, y sirviéndose de ella como guía, se secciona la cara anterior de la porción descendente del duodeno en su línea media; la parte horizontal superior oblicuamente, de modo que encuentre el píloro al nivel de la corvadura mayor; el estómago a lo largo de esta corvadura, hasta el cardias, y la porción horizontal inferior del duodeno en la línea media de su cara anterior. Cuando el corte ha comprendido la parte pilórica de la corvadura mayor, se procede a la recolección del contenido estomacal utilizando una capsulita.

Después de practicada la total sección, se separan las paredes para estudiar detenidamente la mucosa. En caso de existir sangre en el estómago y sospechando una hemorragia estomacal producida por una ulceración y no se vea claramente el sitio en que el vaso está roto, se busca el tronco de la coronaria correspondiente y se inyecta agua, estudiando por dónde sale antes de que otras secciones dificulten la operación.

Para comprobar la permeabilidad del conducto colédoco se verifica su sondaje. Como es sabido, la desembocadura de este conducto tiene lugar, con el de Wirsung, en una papila existente en la parte del duodeno apoyada sobre la cabeza del páncreas; para ponerla de manifiesto se recordará que se encuentra a unos cuatro traveses de dedo por debajo del píloro, y después de limpiar la superficie de la mucosa con una esponja en esta región, se la verá aparecer y se introducirá el cateter por el orificio con cuidado, para salvar las dificultades que los pliegues de la mucosa puedan ofrecer, a fin de que el instrumento siga el conducto sin desgarrar. Si la papila no apareciera claramente, se comprime con la mano izquierda la vejiga biliar o el colédoco a lo largo, en el mismo sentido del curso de la bilis, para que al salir algunas gotas de ésta se marque claramente el sitio donde el orificio se encuentra; si no saliera bilis por encontrarse obturado el conducto o por alguna otra razón, se puede hacer bien aparente la papila siguiendo el consejo de Orth, es decir, atirantando la mucosa transversalmente al nivel de la cabeza del páncreas; pero si a pesar de todo no damos con el orificio, practíquese el cateterismo retrógrado incindiendo el colédoco sobre el omento gastro-duodenal, introduciendo el cateter por la sección inferior y sacándolo por el

orificio de la papila. Una vez verificado el cateterismo, de cualquier modo que sea, se incinde el conducto a lo largo en toda su extensión.

La investigación del ligamento hepato duodenal se practica introduciendo el índice de la mano izquierda por el hiatus de Winslow, en la bolsa de los omentos, y levantando ligeramente se seccionan el colédoco, la arteria hepática y la vena porta.

A continuación se seccionan los ligamentos que sujetan al hígado y se extrae éste al mismo tiempo que el estómago, duodeno y páncreas. Colocado sobre la tabla con el hílio hacia abajo, después de estudiar sus caracteres, se le corta con el gran cuchillo transversalmente por la mitad de su convexidad hasta la porta para observar su textura; después se invierte su posición y se incinde la vesícula y conductos biliares, tomando nota de su contenido.

Para la investigación del páncreas se puede verificar *in situ* un corte longitudinal en su totalidad, o después de extraído se practican numerosas secciones transversales, desde la cola a la cabeza.

Finalmente, después de estudiar la aorta abdominal, las ilíacas, la vena cava inferior, los vasos linfáticos y ganglios, nervios y ganglios nerviosos, para terminar la autopsia se hace el estudio del intestino, que quedó separado en una bandeja desde el comienzo.

Intestino (apertura). — Introduciendo la rama larga del enterotomo por el extremo duodenal, se le secciona en toda su longitud; en el delgado, en la línea de implantación del mesenterio, y en el grueso, por una de sus bandas musculares longitudinales; para ello basta tirar del intestino, teniendo la tijera entreabierta o cortar abriendo y cerrando, como se hace de ordinario, teniendo cuidado de que el contenido vaya quedando recogido en la bandeja y el intestino abierto se coloque en otra, señalando el sitio donde se encuentra el cabo, para evitar pérdidas de tiempo. Una vez seccionado en toda su longitud y observado con detenimiento el contenido, se examina de nuevo la mucosa, haciendo que desde el cabo duodenal al ilíaco pase sucesivamente extendido entre los dedos de la mano izquierda. Al llegar al ciego íncíndase a lo largo el apéndice vermiforme.

4. Miembros.

La investigación de los miembros no se practica más que en aquellos casos en que se sospecha la existencia de una lesión, procurando siempre que las incisiones sean poco numerosas y lo menos extensas posible, teniendo en cuenta en cada caso los conocimientos adquiridos en la Anatomía y Disección sobre los carecteres y situación del órgano que se investiga y la técnica, para ponerla de manifiesto, distinta según se trate de vasos, nervios, músculos, tendones, ligamentos, articulaciones, etcétera.

Cuando se sospeche la existencia de una lesión de los órganos hematopoyéticos, se investigará el estado de la médula ósea en uno de los huesos largos, y preferentemente en el fémur, extrayéndole en su totalidad y serrándole a lo largo, o sacando solamente pequeñas porciones del hueso.

CAPÍTULO VIII

SEPARACIÓN DEL MATERIAL NECESARIO PARA EL EXAMEN HISTOPATOLÓGICO Y BACTERIOLÓGICO Y PREPARACIÓN DE PIEZAS DE MUSEO

Material para el análisis histológico y bacteriológico. — Hemos dicho repetidamente que no se puede considerar terminada una autopsia mientras no se verifiquen todas las indagaciones complementarias que sean precisas, y no hay que decir que el material necesario para ellas debe ser recogido en el momento más favorable.

Para la investigación bacteriológica debe tenerse en cuenta que, a medida que se avanza en la autopsia, por muchas precauciones que se tengan, la rica flora microbiana contenida en las cavidades naturales abiertas, se esparce, y contaminando todos los humores y órganos dificulta notoriamente el aislamiento de las bacterias patógenas que nos interesan en cada caso.

Aconsejamos, por esta razón, que en todas aquellas ocasiones

en que los datos suministrados por el clínico indiquen la necesidad o conveniencia de verificar el examen bacteriológico de algún humor u órgano, se verifiquen las siembras antes de ninguna otra operación. Claro es que si durante el curso de la autopsia concebimos la sospecha de que exista un microbio determinado y creemos conveniente su determinación, no nos detendremos ante la circunstancia de que el órgano correspondiente haya sido abierto y, por consiguiente, contaminado, casi con seguridad, sino que procederemos a las siembras por los métodos de aislamiento que hemos de describir en la parte bacteriológica para separar el microbio que buscamos de todos los demás y prescindiremos de obtener cultivos por siembra directa, como se consigue con frecuencia sembrando en los primeros momentos.

Como en la mayor parte de los casos la técnica para la obtencion en condiciones asépticas de humores, órganos y otras materias apenas se diferencia en el hombre y en los animales, en el vivo y en el cadáver reservamos el ocuparnos detalladamente de esta cuestión para cuando tratemos de ella en la parte bacteriológica.

En la obtención de humores para el examen histopatológico, tendremos de la misma manera buen cuidado para que el humor que tratamos de analizar no se mezcle con otros humores o con agua o líquidos que puedan alterar su normal composición histológica, siguiendo los procedimientos que indicaremos al ocuparnos de los exámenes hematológico y citológico de otros humores. Idéntica precaución se guardará en el examen bioquímico.

Para el examen histológico de órganos se observarán las siguientes reglas: Evitar la compresión de los órganos y cuantas acciones mecánicas enérgicas puedan alterar su estructura. Tallar los bloques que obtengamos con instrumentos bien afilados para que corten limpiamente, es decir, sin magullar. Hacer que estos bloques sean de espesor proporcionado a la penetrabilidad de los líquidos que se van a emplear para su fijación, induración, coloración, etc., no pasando en general de 5 milímetros, teniendo en cuenta siempre que la penetración se encuentra favorecida por las superficies de sección y dificultada por las superficies naturales. Cuando re-

sulte imposible por la magnitud de las lesiones obtener un bloque en que se encuentre comprendida su totalidad, se procurará que el trozo seccionado sea de la región marginal, de manera que en los cortes aparezca tejido sano, lesion plenamente desenvuelta y, entre ambos, la zona en que la lesión se inicia. Los trocitos serán introducidos rápidamente en el líquido fijador o en el que corresponda, según lo que pretendamos examinar, evitando la acción del agua, aunque sea para lavar.

Ciertas cuestiones pueden ser resueltas mediante un examen microscópico grosero en espesos cortes o en trocitos de órganos aplastados entre dos cristales. Los primeros se realizan utilizando un cuchillo de doble hoja, a los que se puede dar la separación conveniente mediante un tornillo (fig. 2, *11*); bien afiladas ambas hojas, con la mínima separación posible en consonancia con la naturaleza del órgano que se va a seccionar, se coloca el órgano, o un pedazo, sobre una gruesa plancha de goma apoyada sobre una tabla; se introduce el cuchillo en agua, para que las hojas estén húmedas; se aplican los filos sobre la superficie del órgano con una presión moderada, y, mediante un rápido movimiento de vaivén, se introduce en el espesor. Así que ha penetrado suficientemente se le inclina y, cortando de nuevo en esta posición, se desprende la lámina del tejido que queda entre las hojas; se extrae el cuchillo, se le introduce en agua, se separan sus láminas y, agitando suavemente, se separa el corte, que nadará en el agua; basta recoger el corte con un porta y llevarlo a la platina del microscopio, para verificar la observación con un objetivo de poco aumento. De esta manera se puede averiguar, entre otras cosas, la existencia de tubérculos microscópicos en el hígado y otros órganos, sin necesidad de aguardar al resultado de la investigación histológica completa. Si la pericia del que practica los cortes es grande, se llegan a obtener secciones suficientemente finas para practicar coloraciones y otras operaciones complementarias.

La simple compresión entre dos cristales es bastante para averiguar la existencia de ciertos parásitos en los tejidos, por ejemplo, la triquina en los músculos.

Preparación de piezas de museo.—La necesidad de conservar de un modo permanente las lesiones interesantes encontradas en

las autopsias, ha hecho que los anatomo-patólogos dirigieran atención preferente a la resolución de este problema, siendo varios los procedimientos conocidos; pero consecuentes con nuestro propósito de limitarnos en lo posible a la exposición de los métodos que cuenten con una abundante experimentación y sobre los que poseamos juicio propio, expondremos solamente el método de Kaiserling, universalmente empleado en la actualidad.

Fúndase este procedimiento en la fijación de los órganos en una disolución hipotónica de formalina, en donde, según Puppe, la hemoglobina se transforma en hematina ácida, tomando los órganos un color pardo obscuro; después se introducen en alcohol para que la hematina ácida se vuelva hematina alcalina, con lo que los órganos se tornan de nuevo rojos, con un tono igual al que tenían en el momento de extraerlos, y, por último, la conservación definitiva, tiene lugar en una disolución de glicerina en agua, a la que se añade acetato potásico para que el órgano no se vuelva demasiado transparente.

Consta de los siguientes tiempos:

1.° Inmersión del órgano entero, y mejor de gruesas láminas, cuando solamente se trata de demostrar su textura, para que la penetración de los líquidos sea más perfecta, en

Formol.....	200 cent. cúb.
Agua.....	1.000 —
Acetato potásico.....	30 gramos.
Nitrato potásico.....	15 —

En este líquido permanecen los órganos desde dos a cinco o seis días, según el espesor: el primer plazo, y aun menos, para el intestino, y el último, para el hígado y grandes órganos. Cuando se trabaja con órganos enteros, es conveniente verificar profundas incisiones para facilitar la penetración; y si fuera necesario el regularizar las secciones practicadas durante la autopsia, para aumentar la belleza de la preparación, deben hacerse en cuanto comienza la induración, pues si se deja que el proceso avance demasiado, las nuevas superficies de sección tienen diferente aspecto en la superficie y en la profundidad, y esto no puede ser corregido de ninguna manera.

2.° Introducción en alcohol de 90°, de una a seis horas, hasta que las piezas adquieran de nuevo el color natural.

3.° Conservación definitiva en

Agua.....	1.000 cent. cúb.
Acetato potásico.....	100 gramos.

Fíltrese y añádase:

Glicerina.....	200 cent. cúb.

Después de renovar el líquido las veces necesarias para que se conserve transparente, se coloca la pieza con líquido nuevo en cubetas de cristal de paredes planas, de forma y tamaño apropiados al órgano, y se cierra perfectamente con un cemento que venden los mismos vendedores de las cubetas, o con cualquier otro preparado de los que se utilizan para pegar cristal.

CAPÍTULO IX

RECONSTRUCCIÓN DEL CADÁVER

En la mayor parte de los casos no es preciso quitar del cadáver parte alguna que sea necesario reemplazar, y la reconstrucción es muy sencilla. Después de limpiar cuidadosamente la cavidad craneal y reponer en ella el cerebro, se adapta de nuevo la calota ósea, se la sujeta con los colgajos cutáneos y se cosen éstos empleando grandes agujas e hilo fuerte, pasando la aguja alternativamente de dentro a afuera en cada lado, a 1 centímetro por fuera del corte. En los casos en que hasta la movilidad de la calota deba disimularse, se pueden hacer algunas perforaciones a un lado y otro de los fragmentos óseos y sujetarlos con hilos fuertes o con alambres. En la cavidad torácica se procede de la misma manera, suturando los cartílagos después de reponer en su sitio los distintos órganos, y una vez colocados los órganos del cuello y del abdomen, se cose la gran incisión de la línea media desde el cuello hasta el pubis. De la misma manera se reponen los demás órganos que hayan

sido extraídos y se suturan todos los cortes practicados en la piel.

Si es necesario el conservar en la colección anatomopatológica uno o más órganos viscerales, para evitar el vacío más o menos parcial producido en la cavidad correspondiente, deben ser sustituídos con algodón, paja, virutas, etc., para que las cavidades y paredes tengan aproximadamente la tensión y aspecto que les corresponde. Si es la bóveda craneal lo que se desea conservar, será forzoso el sustituírla por una semejante moldeada en cartón o en escayola; si es la mitad posterior del ojo, la reemplazaremos con algodón teñido de negro para que la pupila no se aclare; el ojo entero será sustituído por otro de cristal; si son huesos, enteros o no, trozos de palo de la misma longitud impedirán que los miembros se doblen por donde no deben, etc.; en cada caso el ingenio del operador encontrará medios adecuados para impedir que la familia se sienta lastimada en sus más piadosos sentimientos, sobre todo si se considera que, una vez amortajado el cadáver y colocado en el ataúd, maniobras que deben ser practicadas en el mismo departamento, la familia sólo puede observar a sus anchas la cara y las manos.

PARTE SEGUNDA

HISTOLOGÍA PATOLÓGICA

A) Técnica general [1]

CAPÍTULO PRIMERO

I.—Elección de microscopio

Existen actualmente muchos excelentes fabricantes de microscopios de observación, aplicables tanto a los estudios bacteriológicos como histológicos, Zeiss, Hartnack, Seibert y Leitz en Alemania; Reichert en Austria; Nachet en Francia, son los constructores de más renombre.

Cuando se trata de microscopios de poco aumento (de 100 a 400 diámetros), es indiferente dirigirse a uno u otro fabricante, salvo las diferencias de precio, pues todos proveen de instrumentos serios y bien construídos; pero si ha de comprarse un aparato de gran potencia (de 100 a 1.200 o 1.600 diámetros), vale la pena de encargarlo a los constructores más afamados, tales como R. Zeiss, de Jena, y Hartnack, de Postdam, que pasan por ser los más notables especialistas en objetivos de inmersión homogénea. Como es sabido, los objetivos apocromáticos y de inmersión homogénea del primero de estos fabricantes, que llevan por nombre 1'30, 1'40 y 1'63 (ángulos de abertura numérica), son los más caros conocidos (400, 500

(1) No es nuestro ánimo dar aquí un curso de técnica micrográfica. Suponemos al lector enterado, por la histología y técnica generales, de la teoría y práctica del microscopio, aparatos accesorios, reactivos, etc., etc. Nuestro propósito se reduce a exponer cómo pueden aplicarse al estudio de la anatomía patológica los instrumentos y métodos analíticos usados en la demostración de la estructura normal de los tejidos.

y 1.000 francos respectivamente) (1); pero son también los que suministran las imágenes más puras y gozan del más alto poder resolutivo.

Combinaciones ópticas aconsejables. — El aficionado a los estudios de Anatomía patológica puede proponerse una de dos cosas: o inquirir sencillamente la estructura de las neoplasias y la composición química y morfológica de los productos morbosos, o estudiar los microbios que se mezclan a los tejidos patológicos y líquidos orgánicos.

Al primer fin a que tienden comunmente los estudiantes de modesto peculio, basta un modesto o pie mediano de microscopio (Stativ) con aumentos de 60 a 600 diámetros.

Por ejemplo:

El modelo Va de Zeiss, con aparato de iluminación Abbe, objetivos A, C, E, oculares 2 y 4, con un precio (catálogo de 1895) total de 323 francos.

El segundo fin (examen de carioquinesis y microbios) se satisface solamente con microscopios provistos de un buen objetivo de inmersión homogénea y oculares compensadores.

Por ejemplo:

Modelo o *Stativ* igual o algo mejor (Stativ IV a de Zeiss, con cremallera para descenso rápido, diafragma íris, aparato Abbe); objetivo apocromático, 1'30 de apertura, 2 de distancia focal (400 francos); dos oculares compensadores números 8 y 12 (75 francos). En suma, conservando el primer modelo, hay que añadir, aproximadamente, 475 o 500 francos al gasto inicial (2). El objetivo 1'40, excelente como poder resolutivo, no

---

(1) En los modernos catálogos la casa Zeiss ha disminuído cerca de un 20 por 100 el precio de los objetivos apocromáticos. En los años últimos (1914-1918) por causa de la guerra se ha hecho imposible la adquisición de microscopios alemanes. Actualmente sólo es dable conseguir modelos americanos, bastante aceptables, fabricados por las casas Spencer y Busch.

(2) En cuanto a los pequeños modelos, llamados de ***estudiante***, con un objetivo y pie ruin, no los aconsejamos a nuestros lectores, porque si bien el precio es modesto (100 a 130 francos), en cambio desmayan la afición en vez de ayudarla y fomentarla. Y cuando, por excepción, el principiante compra ulteriormente un modelo mejor, resulta el antiguo inútil trasto de laboratorio.

es un objetivo práctico, por la gran facilidad con que la lente frontal, montada casi en el aire, se disloca. El objetivo 1'60 sólo se emplea para diatomeas.

En las combinaciones ópticas citadas prescindimos de todo lo accesorio, de aquello que atañe, no a la utilidad, sino a la comodidad (revólver porta-objetivos, platinas movibles, etc.); pero no podemos descartar, en ningún caso, el aparato iluminador Abbe, sin el cual sería dificilísimo aprovechar toda la potencia del objeto *a seco* E, y, con mayor razón, la del apocromático a inmersión homogénea 1'30.

Los demás fabricantes, sobre todo Leitz en Wetzlar, Nachet en París, Koriska en Milán y Reichert en Viena, proporcionan combinaciones semejantes, pero con un cuarto o tercio de baratura sobre los precios de Zeiss. En la actualidad casi todas las casas constructoras de microscopios fabrican objetivos de inmersión semiapocromáticos 1/12 de longitud focal con 1'30 de apertura numérica, que sin llegar a reunir las excelencias de los apocromáticos de Zeiss, son más que suficientes para el examen de microbios y el estudio de los más finos detalles de las preparaciones histológicas, permitiendo adquirir una combinación óptica equivalente a la que acabamos de indicar, por 500 a 600 pesetas. Al lector toca elegir, teniendo en cuenta el objeto que se propone y el dispendio que puede soportar. Pero no eche en saco roto estos tres consejos:

1.° Conviene comprar desde luego un buen pie o modelo para que, si más adelante queremos completar el equipo, quepa instalar bajo la platina el aparato de Abbe u otros accesorios, como polarizador, etc. Los modelos pequeños no tienen espacio para estas intercalaciones.

2.° Jamás debe el micrógrafo dirigirse a casas desconocidas, que proporcionan instrumentos de pacotilla, de mucha apariencia y poco provecho, y que, en todo caso, sería imposible completar ulteriormente con objetivos de constructores serios y afamados.

3.° En estos casos, como en todo, lo más caro lo es por alguna razón; generalmente, el precio superior viene a premiar un esmero delicadísimo en las correcciones cromáticas de las lentes, así como la regularidad y constancia de la buena construcción.

II. — Microtomos

La construcción de estos instrumentos se va perfeccionando de día en día, y actualmente se encuentran en el mercado microtomos que nada dejan que desear desde el punto de vista de la solidez y de la regularidad con que se obtienen cortes finos y extensos.

Como microtomos universales, es decir, aplicables tanto a las inclusiones en parafina como a las en goma, celoidina, etcétera, pueden aconsejarse los siguientes modelos:

A) Ascensión del porta-piezas por un plano inclinado; marcha de la navaja por un carril o resbaladera. — Modelos de Thoma-Jung (Heidelberg), medianos y grandes, cuyo precio oscila entre 150 y 275 pesetas. — Modelo Jung-Reichert, algo más económico (gran tamaño, 225 pesetas) y fabricado por C. Reichert en Viena. — Modelo A. Becker (Göttingen), excelente, con movimiento automático de la navaja y resbaladeras de cristal para evitar el engrase (precio, según el tamaño, desde 250 a 760 pesetas), etc.

B) Ascensión del porta-piezas a beneficio de un tornillo micrométrico, navaja móvil en una resbaladera y sujeta sobre un bloque metálico. — Modelo de Reichert, automático (180 pesetas, tamaño mediano). — Nuevo modelo automático de este autor, con rueda destinada a mover automáticamente no sólo el porta-objetos, sino la navaja (300 pesetas). — Modelo de Schanze, perfeccionado recientemente, con una palanca para mover automáticamente la navaja (160 pesetas); el de Becker, a tornillo, también automático, con resbaladeras de cristal (precio variable, según el tamaño, de 300 a 760 pesetas).

Los microtomos principales, aplicables solamente a las inclusiones en parafina, y especiales para los cortes en serie, son:

El modelo llamado de palanca, o de la Sociedad de Cambridge, en que la navaja está fija y el bloque de parafina oscila de arriba a abajo a favor de uua larga palanca empujada por un tornillo micrométrico. El precio es de 175 pesetas. — El modelo llamado de *Minot,* construído por Zimermann, de Leipzig, completamente automático, y en que el movimiento de ascenso y de descenso del bloque de parafina se obtiene a be-

neficio de un pequeño volante y una excéntrica. El precio de este microtomo, el más perfecto y bello de los automáticos a la parafina, sube a 270 pesetas.

Para estudios de Anatomía patológica resultan muy convenientes y son muy utilizados los microtomos de congelación. Gracias a ellos pueden conseguirse excelentes cortes de una neoplasia veinticuatro horas después de su fijación. Actualmente existen en el mercado muy buenos modelos de esta especie de microtomos, dispuestos para congelar mediante el ácido carbónico líquido guardado en cilindros metálicos especiales. El endurecimiento se obtiene casi instantáneamente. Al efecto, deben usarse piezas empapadas en agua y previamente fijadas en formol al 10 por 100. Nosotros nos servimos, con excelente resultado, de un microtomo de congelación económico, fabricado por Becker (1908).

Advertencias sobre los microtomos. — 1.ª Cuando no se quiera comprar más que un microtomo, debe darse la preferencia a los universales, es decir, a los que sirven para cortar en parafina y celoidina (modelos de Thoma-Jung, Reichert, Schanze, Becker, etc.).

2.ª En estos modelos, y en general en los que sirven para cortar en celoidina, téngase en cuenta que la dimensión de los cortes guarda relación con la longitud del microtomo; así, con microtomos cortos, donde la navaja no tiene campo de excursión, es imposible hacer secciones extensas (por ejemplo, de un globo ocular entero). Por esta razón, así como los microtomos destinados a cortar piezas incluídas en celoidina pueden ser transformados en universales con sólo cambiar la orientación de la navaja y cambiar la pinza porta-piezas para las incluídas en parafina y las congeladas, los especiales de parafina y congelación no pueden ser considerados como universales, a pesar de lo afirmado por algunos fabricantes, aunque se cambie la orientación de la navaja, pues su campo de excursión es limitadísimo.

3.ª La pinza porta-piezas debe permitir toda clase de movimientos. La forma de pinza más aceptable es la llamada del *laboratorio de Nápoles,* adoptada hoy por casi todos los constructores.

4.ª El éxito de la microtomía depende, en general, de dos

condiciones: de un perfecto endurecimiento y encastramiento (en celoidina, parafina, etc.) de la pieza, y de que la navaja esté bien afilada, para lo cual el principiante deberá acostumbrarse a repasarla sobre la piedra fina y en la correa, cuantas veces necesite usar el microtomo.

5.ª La navaja debe cortar todo lo oblicuamente posible, como aserrando, aprovechando al efecto casi todo el filo del instrumento cuando se trate de piezas englobadas en celoidina, introduciéndose en forma de cuña o raspando como el cepillo de carpintero en las piezas incluídas en parafina.

6.ª El bloque conductor de la navaja en los microtomos por deslizamiento ha de ser pesado, con relación a la misma, a fin de que no cabecee u oscile al imprimirle movimiento con la mano.

He aquí por qué los pequeños modelos de microtomo son de difícil manejo.

Cuando haya que cortar órganos de gran volumen, tales como cerebros humanos, los modelos comunes son insuficientes; en este caso hay que recurrir al gran microtomo de tornillo llamado de Gudden, o al gran modelo automático de Reichert. Recientemente (1899) ha puesto a la venta Nageotte, de París, un excelente modelo de microtomo para cortes de cerebros enteros. Otro modelo, todavía más perfeccionado, ha sido ideado por O. Vogt, con destino al Instituto neurobiológico de Berlín (1907). Un instrumento parecido, más perfeccionado aún, es fabricado en España por el ilustre ingeniero Torres Quevedo, que ha imaginado también modelos económicos para la sección de parafina.

CAPÍTULO II

I.—Fijación e indURación de las piezas patológicas

Alcohol.—Es un excelente indurante y fijador para la mayor parte de los tejidos, sobre los cuales obra, extrayendo el agua y coagulando los albuminoides. La ventaja más valiosa de este reactivo estriba en que no altera las afinidades que para las materias colorantes tienen, tanto los núcleos como los microbios.

La manera de usarle es sencillísima. En un frasco donde haya abundante alcohol de 40° (por ejemplo, 300 o 400 centímetros cúbicos), se abandonan dos o tres trozos de tejido cuyo espesor no pase de centímetro y medio. La anchura puede ser mucho mayor.—El líquido se renovará dos o tres veces en cosa de dos a cuatro días. Si el alcohol es fuerte (40° o más grados) y las piezas muy voluminosas, al cabo de media semana puede emprenderse la ejecución de los cortes.

El alcohol se emplea también para acabar la induración iniciada por los siguientes reactivos fijadores:

Líquido de Müller:

Bicromato de potasa.....	2'5	gramos.
Sulfato de sosa	1	—
Agua.....	100	—

En este líquido, que se renovará cada cuatro o cinco días, permanecerán las piezas, según la temperatura, desde veinticinco días a dos meses. Obtenida la induración, se lavarán en agua y se conservarán en alcohol de 40°, donde experimentarán un suplemento de consistencia muy apropiado para la ejecución de cortes finos.

El líquido de Müller indura mucho mejor que el alcohol los centros nerviosos. Tiene sobre éste también las ventajas de retraer menos los tejidos, conservar los hematíes y hacer más perceptibles los intersticios celulares.

El líquido de Erlicki, en que el sulfato de sosa está consti-

tuído por igual cantidad de sulfato de cobre, endurece más a prisa; pero no respeta tanto las afinidades de los núcleos respecto a las materias tintóreas.

Sublimado corrosivo. — Se emplea a saturación, ya en agua destilada, ya en solución de sal al 0'5 por 100. Endurece bastante, aunque no tanto como el alcohol. Su acción fijadora es mucho más eficaz, conservando muy bien la textura del núcleo y figuras carioquinéticas. El reactivo debe actuar sobre las piezas veinticuatro horas no más: luego se lavan por otras veinticuatro en agua común, y, finalmente, se endurecen y conservan en alcohol fuerte, añadiendo cristales de yodo hasta que el alcohol tome el color de vino de Oporto y este color persista durante algunas horas, en cuyo momento se cambia por alcohol limpio. Esto tiene por objeto acabar de quitar el sublimado.

Los tejidos tratados por este método son apropiados para obtener la coloración triple con el líquido de Biondi (véase más adelante), compuesto de fuchina ácida, naranja y verde de metilo, previa inclusión y sección en parafina.

Si se desea preparar la solución de sublimado con toda precisión, júntense:

Sublimado.....	7'50 gramos.
Cloruro de sodio.....	0'50 —
Agua destilada.....	200 cent. cúb.

Mejor resultado que la simple disolución acuosa concentrada de sublimado proporciona su mezcla con el 5 por 100 de ácido acético o los líquidos de Zencker y Helly. El líquido de Zencker está formado por

Sublimado.....	0'5 gramos.
Sulfato sódico.....	1 —
Bicromato potásico.....	2'5 —
Agua destilada.....	100 —

Antes de usarlo se añade:

Acido acético.....	5 cent. cúb.

Como se ve, es el líquido de Müller con 0'5 de sublimado y 5 por 100 de ácido acético. En el líquido de Helly el ácido acé-

tico es sustituído por 5 por 100 de formol al 40 por 100 (formalina).

El líquido de Foa, que es igualmente líquido de Müller con el 2 por 100 de sublimado, es un excelente fijador para los órganos hematopoyéticos (médula ósea, ganglios linfáticos, etc.).

Líquido de Flemming. — Excelente cuando se pretenden teñir las figuras carioquinéticas y la grasa de las preparaciones. Es también decalcificante.

He aquí su composición:

Acido ósmico al 2 por 100.....	4	gramos.
— crómico al 1 por 100.....	15	—
— acético.....	1	—

Mezcla de Fol. — Es un líquido de Flemming más débil y en ocasiones más conveniente, por cuanto respeta mejor las afinidades tintóreas de las células.

Acido crómico al 1 por 100.....	25	gramos.
— ósmico al 1 por 100.....	2	—
— acético al 2 por 100.....	5	—
Agua.....	68	—

En la mezcla de Flemming y de Fol permanecerán las piezas de dos a veinticuatro horas, según el volumen; luego se lavarán en agua y concluirán de indurarse en alcohol.

Como proceder de inclusión de las piezas así fijadas se prefiere el de la celoidina, y, como agentes colorantes más beneficiosos, la safranina y hematoxilina.

Ácido pícrico a saturación. — Heidenhain lo recomienda como indurante y fijador para los epitelios y glándulas. Las piezas deben estar unas veinticuatro horas en la solución pícrica, trasladándose después al alcohol. El teñido se verifica en masa y al carmín. El proceder de inclusión preferible es el de la parafina.

Solución saturada de ácido fénico. — Es un buen fijador, que tiene la ventaja de facilitar la coloración de los microbios y de los núcleos en las piezas patológicas. Se utiliza sobre todo para tumores, que permanecerán veinticuatro horas en dicha solución; se lavarán por algunos minutos en agua común,

y se llevarán al alcohol, donde se completará la induración.

Acetona. — Empleada pura indura más rápidamente todavía que el alcohol, respetando las afinidades tintóreas de los núcleos. Se usará de preferencia cuando deseemos abreviar el tiempo de induración.

Formol o formalina. — Propuesto hace unos diez años como un sustituto precioso del ácido ósmico, y aun del bicromato de potasa, se emplea en solución acuosa al 10 por 100. Fija las células tan bien como el ácido ósmico, al que lleva la ventaja de no alterar en nada las afinidades tintóreas de los núcleos.

Para la induración y conservación de los centros nerviosos, Parker y Floyd (1896) aconsejan esta mezcla: solución al 2 por 98 de formol, cuatro volúmenes; alcohol de 95°, seis volúmenes. En poco más de una semana puede endurecerse un cerebro entero, al que presta una elasticidad particular.

Según Blum (1896), la ventaja más preciada es la rapidez con que se logra el endurecimiento de las piezas con el formol. Aconseja someter éstas por cuatro a seis horas a la solución al 10 por 100 de este reactivo, trasladándolas después al alcohol absoluto, donde permanecerán igual tiempo e incluirlas en celoidina. Nuestra experiencia es favorable a este método, que resulta muy eficaz y expedito para el estudio de las neoplasias.

Este reactivo, en solución acuosa al 5 por 100, puede servir también para conservar indefinidamente las piezas patológicas en los Museos.

Recuérdese que la previa fijación en formol (sin alcohol consecutivo) es excelente para las piezas destinadas a la congelación.

Según nuestros ensayos, una mezcla de dos partes de acetona y una de formol, constituye un fijador ideal, que conserva admirablemente el volumen de las piezas y endurece notablemente (1908).

Fijador de Bouin:

Formol	10	cent. cúb.
Solución acuosa saturada de ácido pícrico.	30	—
Acido acético cristalizable	2	—

Al cabo de veinticuatro horas los tejidos hállanse fijados; después se lavan los bloques en agua corriente durante una o dos horas y se completa la induración en alcohol.

Líquido de Orth. — Es el líquido de Müller con el 10 por 100 de formol.

Fijación por cocción.— Cociendo durante algunos minutos pequeños trozos de órganos, se coagulan las materias albuminoideas, e indurando después en alcohol de 96°, se obtienen buenas demostraciones del edema pulmonar, cilindros urinarios y líquidos albuminosos que rellenan los quistes.

II. — Decalcificantes

Los tejidos patológicos que contienen formaciones óseas o cartilaginosas con incrustaciones, o depósitos calcáreos, deben privarse de sus sales, para darles la consistencia compatible con la ejecución de cortes finos.

Con tal objeto, úsanse diversos líquidos ácidos, entre los cuales los más importantes son:

1.° Ácido sulfuroso concentrado durante veinticuatro horas, y lavado de otras veinticuatro horas.

2.° Ácido nítrico al 5 por 100, agitando frecuentemente, y mejor todavía en aparato agitador, neutralizando después un día con disolución al 5 por 100 de sulfato de litio, o de sodio, o de alumbre de potasio, y lavando dos días en agua corriente.

Si no se ha fijado previamente el tejido, se puede emplear formol al 10 por 100 con otro 10 por 100 de ácido nítrico. También da buenos resultados la *mezcla de Haug a la floroglucina:*

Floroglucina.....	1 gramo.
Ácido nítrico.....	10 cent. cúb.

Caliéntese hasta disolución y añádase:

Agua destilada.....	50 —

Complétense 300 cent. cúb. con disolución de ácido nítrico al 20 por 100. Decalcifica rápidamente y parece proteger por la floroglucina los demás tejidos.

Los líquidos de Mayer y de Thoma son disoluciones alcohólicas de ácido nítrico: el primero al 5 por 100 en alcohol de 90 por 100, y el segundo al 20 por 100 en alcohol al 96 por 100.

3.° Ácido clorhídrico del 1 al 3 por 100 en mezclas acuosas o alcohólicas, poco recomendable porque altera las finas estructuras y las apetencias tintóreas.

4.° Ácido tricloracético al 5 por 100 con el 10 por 100 de formalina, según Partsch, que también proporciona excelentes resultados.

Cuando se trata de tejidos que contienen escasa cantidad de cal y se puede verificar una decalcificación sumamente lenta, puede usarse el ácido pícrico en saturación acuosa o el ácido crómico al 2 por 100 solo, en el líquido de Flemming o mezclado con el líquido de Müller.

Observaciones. — La cantidad de líquido con relación a las piezas debe ser considerable para que la decalcificación sea rápida.

Antes de decalcificar toda pieza deberá ser fijada y endurecida en formol, alcohol, líquido de Müller, sublimado, etc.

Extraídas las piezas del líquido decalcificante, se lavarán, por veinticuatro o cuarenta y ocho horas, en agua destilada; después volverán al alcohol, donde se deshidratarán, esperando la inclusión definitiva.

La mejor materia de inclusión es la celoidina; la parafina produciría excesiva consistencia. Los cortes se teñirán con safranina, carmines, hematoxilina, etc.

De todos los decalcificantes, el más rápido es el de la floroglucina de Haug. Las piezas de mediana dimensión quedan privadas de la cal en un tiempo que oscila entre una y doce horas. Con las demás fórmulas es precisa una maceración de varios días.

Teniendo en cuenta que todos los líquidos decalcificantes alteran más o menos las apetencias colorantes de los tejidos es conveniente vigilar la marcha de la decalcificación para suspender la acción del reactivo tan pronto como la cal haya desaparecido; para ello, si la masa calcárea es grande, se introduce una aguja a su través, y si es de pequeñas porciones, se verifican cortes con un escalpelo hasta que no se note resistencia.

Si, después de incluída en celoidina una pieza cualquiera, nos encontráramos al cortar que presentaba pequeñas inclusiones calcáreas que hacen imposible la sección, se puede decalcificar el bloque incluído, llevándolo a continuación al alcohol para verificar los cortes.

III. — Eliminación de los pigmentos y de la grasa

La eliminación de los pigmentos puede verificarse por oxidación, reducción o disolución. La primera se consigue por el cloro que se desprende colocando unos cristales de clorato potásico con unas gotas de ácido clorhídrico en un frasco, vertiendo sobre ellos alcohol al 70 por 100 tan pronto como empieza el desprendimiento y haciendo que permanezcan los cortes allí uno o dos días. También se puede emplear la disolución de cloro de la casa Merk, poniendo 2 cent. cúb. con 15 centímetros cúbicos de alcohol al 95 por 100, o la disolución de agua oxigenada del 3 al 10 por 100. La reducción se verifica en disolución concentrada de ácido sulfúrico en alcohol, y la disolución del pigmento empleando disoluciones alcohólicas de ácido clorhídrico o nítrico, de lejía de sosa (3 gotas en 15 centímetros cúbicos de alcohol de 96 por 100).

El desengrasamiento se consigue llevando las piezas un día al éter o al cloroformo después de la fijación, volviéndolas después al alcohol. Es operación necesaria cuando se trata de decalcificar huesos que tengan gran cantidad de grasa.

CAPÍTULO III

OBTENCIÓN DE CORTES OBSERVABLES AL MICROSCOPIO

A) Cortes sin inclusión

Después de indurar en alcohol piezas fijadas en reactivos distintos, con una navaja de microtomo bien afilada se pueden obtener cortes suficientemente finos para ciertas observaciones histológicas, sujetando el bloque que se va a seccionar con los dedos o en el clásico microtomo de Ranvier siempre que se

posea cierta habilidad; pero la introducción en la técnica de los microtomos de congelación mediante el anhídrido carbónico líquido, ha facilitado de tal modo la práctica de los cortes, que puede decirse que en histología patológica es quizá el procedimiento utilizado constantemente, a menos que razones especiales no indiquen la necesidad o la conveniencia de realizar los cortes en piezas incluídas.

En los cortes practicados mediante inclusión se mantiene la unión de sus distintos elementos por la substancia fundamental que los une naturalmente y por la materia de inclusión, en tanto que los cortes obtenidos por la congelación, así que sobreviene el deshielo, si no son de tejidos que cuenten en su textura con una substancia unitiva bastante resistente se disgregan por completo, marchándose cada elemento por su lado. Esto pasa en aquellos tumores blandos formados por aglomeraciones de células sin substancia fundamental o en los que ésta es semilíquida; en la mayor parte de los tejidos normales y patológicos, sin embargo, existe una substancia fundamental que permite la obtención de cortes por congelación y en algunos tejidos, como el nervioso, y otros de consistencia homogénea se logran tan finos como con una buena inclusión en celoidina.

Los cortes por congelación pueden ser obtenidos de piezas recién extraídas en una autopsia o en una operación quirúrgica, permitiendo en este último caso, en algunas ocasiones, obtener un diagnóstico histológico rapidísimo que permita juzgar del grado de mutilación a que debe llegarse. Fuera de estos casos de urgencia grande los cortes en congelación deben practicarse en piezas fijadas en los fijadores indicados por los métodos de coloración que se van a emplear, debiéndose tener en cuenta que en la congelación los bloques deben estar empapados en agua, para lo cual es preciso introducir las piezas fijadas en líquidos alcohólicos en formol al 10 por 100 durante unas horas para que se hidraten y las fijadas en soluciones acuosas de distintas sales lavarlas bastante tiempo, cambiando el agua hasta que desaparezcan las sales, que habrían de estropear seguramente la navaja. Las piezas fijadas en formol en disolución acuosa a distintas concentraciones pueden ser cortadas directamente con sólo lavarlas rápidamente, pudiendo decirse que este es el líquido preferible en los cortes de congelación.

Una vez fijada, o fijada e hidratada, o lavada, según los casos, la pieza que se va a cortar, se coloca en la platina de congelación sobre un pedacito de papel chupón humedecido, dándole la orientación conveniente, se enjuga el agua excedente y sujetándola con los dedos o con agujas, si no se sostiene bien por sí sola, se abre la llave de acceso del ácido carbónico con intervalos para que el frío producido en la platina tenga tiempo suficiente para propagarse. En seguida comienza la congelación, que se hace perceptible porque el bloque queda adherido y porque en su parte inferior se forma una franja de color blanco correspondiente a la región congelada que, a medida que progresa por los sucesivos golpes de ácido carbónico, asciende visiblemente hasta alcanzar la superficie. Cuando la franja blanca está ya cerca de la superficie se comienza a cortar con la navaja y los cortes obtenidos nos indicarán el estado de la congelación; si se desgarran la congelación es todavía insuficiente, si se arrollan comienza a ser excesiva, debiendo esperar un ratito verificando ensayos de tiempo en tiempo hasta que se caliente algo el bloque; el momento preferible es el intermedio entre ambos en que los cortes, perfectos en toda su extensión, van quedando acumulados sobre la navaja. Los cortes recogidos con los dedos, con pinzas o un pincel son llevados a un pocillo con agua, donde al calentarse se estiran.

Los cortes recogidos en el agua serán sometidos a las demás operaciones de teñido y montaje, como los cortes de piezas incluídas que se describen a continuación, y por eso no insistimos en ello.

B) Métodos de inclusión para facilitar la ejecución de cortes finos

Así se llama la operación de englobar o hacer penetrar en el espesor de las piezas ya fijadas una materia inofensiva, capaz de solidificarse con el fin de prestar a la trama histológica una consistencia apropiada a la práctica de finas secciones.

Muchas son las materias que con tal objeto se han propuesto.

verbigracia: el jabón, la goma, la gelatina, la albúmina, el agar-agar, etc.; pero el anatomo-patólogo deberá preferir, para casi todos los casos, los dos métodos más valiosos y prácticos: la *inclusión en celoidina* y la *inclusión en parafina.*

Inclusión en celoidina.

La celoidina es una especie de colodion seco, de color ambarino, que se disuelve lentamente en una mezcla, a partes iguales, de éter a 65°, y alcohol de 40°, o absoluto. Algunos proponen la *fotoxilina,* que se disuelve más rápidamente en la mezcla alcoholico-etérea; pero no posee ventajas sobre la celoidina, si hemos de juzgar por propias experiencias.

La solución de celoidina debe tener consistencia de jarabe espeso. En ella permanecen uno o varios días las piezas; después son abandonadas por veinticuatro horas en alcohol de 36° o cloroformo puro. Estos líquidos roban el éter de la celoidina, que adquiere una consistencia semejante al caucho.

Antes de incluir las piezas, deben venir del alcohol, y se supone que han sido preventivamente fijadas. Para mayor claridad, he aquí la marcha de las operaciones necesarias a una buena inclusión:

1.ª Los trozos de tejido o neoplasia, de un espesor que no pasará de 1 centímetro (la anchura es indiferente), permanecerán veinticuatro horas en una mezcla de éter y alcohol.

2.ª Después se sumergirán, por veinticuatro a cuarenta y ocho horas o más (según el espesor de las piezas) en una primera solución de celoidina al 2 por 100.

3.ª Durante dos, tres o más días, atendido el volumen, se empaparán las piezas en una segunda solución de celoidina al 5 o más por 100. Este líquido debe tener consistencia de espeso jarabe.

4.ª Extraída la pieza de la celoidina, se montará inmediatamente (evitando la desecación del vehículo) sobre un corcho limpio y seco, o sobre un trozo de madera. Pegada a tal soporte, quedará expuesta al aire durante algunos minutos, a fin de que se condense un tanto más la celoidina envolvente.

5.ª Los corchos o maderas con los objetos pegados se introducirán en un frasco de boca ancha que contenga alcohol

de 36°. Aquí permanecerán las piezas (que deben quedar envueltas por el alcohol) unas veinticuatro horas.

6.ª Puesta la pieza con su soporte de corcho en la pinza porta-objetos del microtomo, se procederá a seccionarla, cuidando lubrificar la navaja con alcohol de 36°.

7.ª Los cortes serán recogidos en agua, donde permanecerán hasta el momento de ser teñidos. Si la tinción debe realizarse al cabo de dos o más horas, la conservación de los cortes en el ínterin debe efectuarse en alcohol de 36°.

8.ª Coloración de los cortes en litio-carmín, carmín aluminoso, hematoxilina, etc. (véase más adelante).

9.ª Lavado de los cortes.

10. Deshidratación en alcohol.

11. Aclaramiento en la esencia de clavo (para quitar la celoidina) o en la creosota (para conservar la inclusión).

12. Montaje en bálsamo disuelto en xilol.

Observaciones. — Este método de inclusión es aplicable a todos los tejidos anormales, sin excepción, aun los más duros, a condición de estar decalcificados.

El tiempo necesario al englobamiento podrá abreviarse mucho si las piezas son muy pequeñas (3 o 4 milímetros de espesor).

En tal supuesto, cabe practicar todas las operaciones de la inclusión en unas doce o catorce horas, pudiendo prescindirse del primer baño de éter y alcohol, y aun de la primera solución de celoidina.

Inclusión en parafina.

En Anatomía patológica no es tan valioso este método de englobamiento como en Histología normal y embriogenia, porque la mayor parte de los tejidos patológicos adquieren con él excesiva dureza. Con todo, será aplicable a la obtención de secciones finas del pulmón tuberculoso o inflamatorio de los nervios, intestino y las neoplasias, sarcoma, linfoma, carcinoma encefaloides, cistoma y adenoma.

El orden de las operaciones es el siguiente:

1.° Las piezas, convenientemente fijadas y deshidratadas, se colocarán en una mezcla, a partes iguales, de alcohol y clo-

roformo. El cloroformo debe echarse después del alcohol, y a favor de una pipeta, que penetrará hasta lo más hondo, a fin de constituir una capa profunda exclusivamente clorofórmica. En cuanto las piezas, que se mantendrán algún tiempo entre las dos zonas de alcohol y cloroformo, descienden del todo, pueden trasladarse:

2.° Al cloroformo puro, donde quedarán dos o tres horas.

3.° Del cloroformo se transportarán a una solución concentrada de parafina en cloroformo, donde se abandonarán por dos a tres horas.

4.° Después se conducirán a un baño maría (1) que contenga parafina derretida y a temperatura apenas superior al punto de fusión. Aquí permanecerán, según las dimensiones, desde dos a cinco horas.

5.° Extraída la pieza, se enfriará repentinamente para que la materia de inclusión se solidifique en cristales finísimos (una solidificación lenta da cristales espesos que estropean los elementos), vertiéndola en cajitas de papel, cristal o metal, embadurnadas de glicerina y orientando la pieza por medio de las agujas calientes; luego se montará en un bloque de parafina, al cual se pegará inmediatamente un escalpelo caliente, terminando la operación recubriendo la superficie de la pieza con una capa de parafina de 3 o 4 milímetros de espesor.

6.° Antes de poner la pieza en el microtomo se tallará en cuadradillo, procurando que una de las caras se dirija hacia adelante. El filo de la navaja deberá ser paralelo a dicha superficie, es decir, perpendicular a la resbaladera; disposición que favorece singularmente la obtención de series o cintas de corte.

---

(1) Utilízase de preferencia el baño maría de Giesbrecht o de Nápoles, el cual está provisto de un termo-regulador de mercurio, termómetro, etc. Su precio viene a ser de 75 pesetas.

En la figura 16 reproducimos otro aparato imaginado recientemente por Adnet, de París, que resulta muy cómodo. Consiste en una especie de platina caliente de dos pisos, donde se colocan los depósitos de parafina y los porta-objetos con series de cortes. El mechero de gas calienta al mismo tiempo un recipiente que puede destinarse a otros usos.

7.° Los cortes se llevan a un porta-objetos, se lavan con esencia de trementina o xilol para quitarles la parafina y se montan en bálsamo. Se supone naturalmente que la pieza fué teñida en masa antes de la inclusión. Ya veremos luego cómo se logra el teñido individual de los cortes.

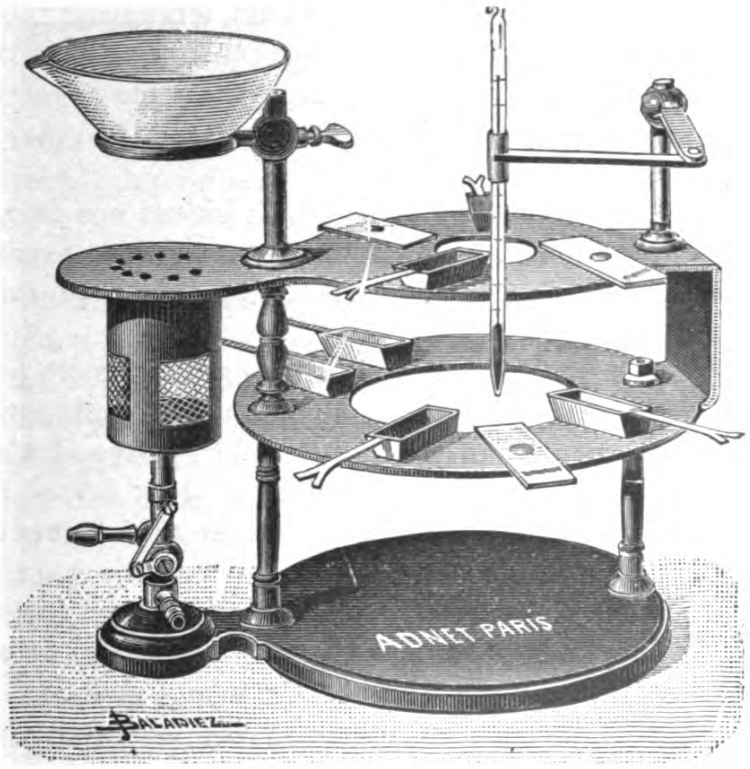


Fig. 16.—Platina caliente de Adnet para inclusiones en parafina.

Observaciones. — *A)* El cloroformo y la solución de parafina en el cloroformo se emplean, antes de la inmersión o en el baño de parafina, para facilitar la penetración de ésta en la trama del tejido. Pero pueden utilizarse con tal fin todos los disolventes de la parafina: la esencia de trementina, la esencia de clavo, la esencia de cedro, el xilol, el petróleo, el toluol, etcétera. El modo de empleo de estos agentes será igual que el del cloroformo.

B) Los cortes de la parafina tienen a veces tendencia a

arrollarse, imposibilitando el logro de las series. Los remedios propuestos son muchos.

He aquí algunos:

Mecánicamente se evita dicho enrollamiento, superponiendo a la pieza, suavemente y mientras se corta, un pincel ancho y flexible. La navaja pasa entonces por debajo de éste y el corte queda plano.

Se aconseja también tallar en prisma triangular de arista aguda anterior el bloque de parafina, con lo que si el corte se arrolla en espiral, podrá desarrollarse a un suave calor en el porta-objetos, teniendo la precaución de poner el lado ancho y la base espiral hacia abajo.

Un procedimiento que para pequeñas piezas nos ha dado resultado, es formar la costra exterior de parafina de capas alternadas (por sumersión y rápido enfriamiento de la pieza) de parafina dura y blanda.

Pero el mejor remedio es usar una parafina cuyo punto de fusión guarde relación con la temperatura del ambiente. Bajó las altas temperaturas del verano (25 a 30°) convendrá una parafina que funda a 55°. En pleno invierno (10 a 12°) se preferirá la parafina que funda a 45°. Finalmente, con temperaturas de transición (18 a 22°) se ensayarán con ventaja parafinas de puntos de fusión de 48 a 50°, o mezclas, previamente ensayadas, de parafina dura y blanda. El punto de fusión de una parafina puede exaltarse por una cocción prolongada.

En vez de servirse del cloroformo y del xilol para facilitar la penetración de la parafina en las piezas, cabe usar con ventaja, según aconseja Bolles-Lée, el aceite de cedro; después de la acción de este agente, la penetración de la parafina es más rápida y los cortes no resultan tan frágiles como cuando se usan el cloroformo, el xilol o las esencias.

Una de las mayores ventajas de la parafina consiste en permitir verificar la inclusión y, por consiguiente, los cortes con gran rapidez, y aunque en la actualidad con los microtomos de congelación se puede verificar el diagnóstico histológico de una pieza patológica en veinticuatro horas y hasta en el momento de extraerla, como no todos los tejidos pueden ser cortados en congelación (productos de legrados, granulaciones, etcétera), la inclusión en parafina no deja de ser utilísima en

todos estos casos. A este fin se han ideado procedimientos ultra-rápidos, mereciendo mención especial los de Lubarsch y Henke-Zeller.

El *método de Lubarsch* consiste en verificar todas las operaciones en estufa a 50°, con lo que se abrevian notablemente.

1.° Piezas de $^1/_2$ centímetro de grueso se fijan en formol al 10 por 100, cambiado dos veces en diez minutos.

2.° Alcohol al 95 por 100, cambiado una vez en diez minutos.

3.° Alcohol absoluto, cambiado dos veces en diez minutos.

4.° Inmersión en aceite de anilina absolutamente puro, de diez minutos a media hora, hasta que la pieza se vuelva transparente.

5.° Introducción en xilol diez a quince minutos, cambiándolo dos, tres veces, hasta que no suelte más color amarillo.

6.° Inmersión en parafina fundida de media a una hora.

7.° Solidificación de la parafina.

El *método de Henke-Zeller* utiliza la rápida deshidratación producida por la acetona.

1.° Pequeñas piezas permanecen de media a una hora en acetona pura, debiendo prolongarse el tiempo en las piezas más grandes.

2.° Inmersión en parafina fundida de media a hora y media, para que la acetona se evapore y la parafina penetre en el tejido. La parafina debe ser cambiada una vez.

3.° Solidificación de la parafina.

CAPÍTULO IV

SERIACIÓN, ADHERENCIA Y MONTAJE DE LOS CORTES EN PORTA-OBJETOS

I.—Cortes a la celoidina

Los cortes a la celoidina podrán seriarse, con sólo recogerlos en una sucesión ordenada de pocillos de porcelana, como los que utilizan los acuarelistas. En cada pocillo sufrirá el corte todas las operaciones de teñido, lavado, deshidratación, acla-

ración, etc., sin confusión alguna, con tal que los pocillos estén numerados.

Cuando los cortes son 1, 2 o 3, no hace falta utilizar ningún procedimiento de anherencia al porta-objetos. Teñidos, deshidratados y aclarados, se lubrifican en una gota de bálsamo y se cubren con una laminilla.

Pero si los cortes son pequeños y numerosos, y se desea montarlos ordenadamente en un solo porta-objetos, cabrá utilizar el artificio siguiente: aclarados y ordenados convenientemente sobre el cristal, se mojan con bálsamo al xilol a poca concentración; cuando transcurrido un cuarto de hora la capa de fijativo esté casi seca (debe cubrir los cortes), ya no habrá inconveniente en proteger el preparado con el cubre-objetos, untado en bálsamo ordinario. La presión de la laminilla no desarreglará las secciones, porque el nuevo líquido conservador será incapaz de reblandecer la costra de fijativo.

Para series largas y cuidadosas, en vez de los procedimientos dichos, debe preferirse el método de Weigert, a saber:

1.° Conforme se obtienen los cortes, se van colocando, empapados en alcohol de 36°, sobre una hoja de papel *closet*, donde, a prevención, tendremos marcado el comienzo de la serie.

2.° El papel (siempre humedecido con alcohol flojo) con los cortes hacia abajo, se coloca sobre una lámina de cristal colodionada, como las que emplean los fotógrafos para dar el brillo. Se aprieta el papel sobre el colodion, y los cortes se adhieren en cuanto aquél se despega.

3.° El cristal y los cortes (que no deben secarse) se cubrirán de una nueva capa de colodion, la cual se dejará coagular durante algunos minutos.

4.° Puestos los cristales en el agua (antes de secarse el colodion) se cubrirán de una nueva capa de colodion con todos los cortes seriados, pudiéndose ya con toda seguridad ejecutar en ella, como si se tratase de un solo corte, todas las operaciones ulteriores de coloración, deshidratación aclaramiento y montaje. La esencia para aclarar será la creosota, que transparenta mucho y no ataca la celoidina.

II.—Cortes a la parafina

Con los microtomos automáticos llamados de Minot y de Cambridge, se obtienen fácilmente, si la parafina posee la debida consistencia, cintas de cortes, que se pegan al porta-objetos a beneficio de los artificios siguientes:

Método de la atracción capilar. — A medida que se obtienen los cortes aislados o las series se depositan en agua a 45° de modo que la superficie cortada, que tiene un aspecto brillante y es la que quedó apoyada sobre la navaja, se apoye igualmente sobre la superficie del agua; a medida que caen sobre el agua se estiran, desapareciendo todas las arrugas; se introduce en el agua, por debajo de los cortes que queremos utilizar, un porta perfectamente desengrasado y se extrae inclinado, al mismo tiempo que se sujetan los cortes con una aguja; se vierte el agua excedente después de dar a los cortes la posición que han de tener en el cristal y se lleva a la estufa de 37° durante doce horas, donde se evapora el agua y el corte resulta completamente adherido.

Licor de Schallibaum:

Colodion normal.....	1 gramo.
Esencia de clavo.....	3 —

Con un pincel se lubrifica, en capa delgadísima, el porta-objetos. Este licor tiene la propiedad de no secarse a la temperatura ordinaria, y de coagularse rápidamente. Fijadas las series, llévase la preparación a un baño maría (a 50 o 60°), donde a la media hora se habrá evaporado la esencia y endurecido la capa de colodion.

Ulteriormente (y en caliente), se extrae la parafina con la esencia de trementina, y se cubre el preparado con una laminilla untada de bálsamo.

Fijador al lacre. — Disuélvase a saturación lacre en alcohol de 40°; al cabo de algunos días el bermellón se precipita, y el líquido claro, puesto a evaporar, abandonará el lacre puro casi incoloro. Se disuelve la resina así lograda (al 10 por 100) en creosota, y obtendremos un licor que, usado en las mismas condiciones que el de Schallibaum, fijará bien las series. La

creosota desaparecerá en la estufa, quedando el lacre sólido, que sujeta la preparación. Los cortes deben estar teñidos a prevención (véase más adelante, teñido en masa), pues el alcohol necesario a las deshidrataciones en porta-objetos disolvería el lacre.

Fijador a la albúmina. — Mézclese una parte de albúmina con otra de glicerina. Con el licor resultante se moja el porta-objetos y se arreglan las series. Luego llévase el preparado a la estufa (a 60°), donde las series quedarán fijas por solidificación de la albúmina. La capa de albúmina debe ser delgadísima, porque de otro modo, como es teñida por varios colorantes, resulta molesta.

Método japonés. — Es una combinación del de atracción capilar y del de la albúmina, y consiste en extender los cortes, según hemos dicho en el primero, sobre portas en que se ha extendido y coagulado una capa de albúmina. Aunque presenta el mismo inconveniente del teñido posterior de la albúmina, tiene la ventaja de fijar los cortes mejor que los demás, siendo por esta razón muy empleado.

CAPÍTULO V

COLORACIÓN DE LOS CORTES

CONSIDERACIONES GENERALES

Cuando los bloques han sido teñidos en masa los cortes resultan ya coloreados; tal sucede en los cortes de piezas teñidas por los métodos de Golgi, Cajal y otros, que se describirán después, al hablar del sistema nervioso preferentemente; pero también las coloraciones que vamos a describir detenidamente, a continuación, para los cortes, pueden en ciertos casos ser empleados para el *teñido en masa*. Este se realiza cuando la pieza acaba de ser fijada e indurada: los líquidos colorantes preferibles al efecto son: la hematoxilina de Böhmer o Ehrlich, el carmín aluminoso, la hematoxilina de Heidenhain, el carmín lítico de Orth y otras muchas coloraciones que se describirán;

las piezas deben ser pequeñas y permanecer de seis a veinticuatro horas en los líquidos colorantes.

Los *cortes a la celoidina*, en la mayor parte de los casos, pueden y deben ser teñidos sin quitar la materia de inclusión porque de este modo se conservan mejor en todas las manipulaciones a que son sometidos; pero si fuera preciso el quitar la celoidina, apelaremos al alcohol metílico, que la disuelve rápidamente. Los cortes son teñidos trasladándolos sucesivamente de unos a otros pocillos donde se encuentran los líquidos que describiremos en los distintos tiempos de los diferentes métodos, o colocándolos sobre un porta-objetos sobre el que se verifican todas las operaciones vertiendo unas cuantas gotas de cada líquido y valiéndose de las agujas para evitar que los cortes se marchen al cambiarlos. Este último procedimiento requiere alguna pericia, pero es mucho más económico en reactivos. También pueden ser teñidos después de seriados y pegados, como hemos indicado antes.

Los *cortes a la parafina* pueden ser teñidos sin quitar la parafina, pero como esta substancia no es bien penetrable por los líquidos empleados en general, es preferible quitarla antes de proceder al teñido. La parafina se disuelve por medio del xilol, y los cortes, después de hidratados por pases sucesivos por alcoholes de menor concentración cada vez hasta llegar al agua, para hidratarlos, se tiñen individualmente como los cortes a la celoidina o pegados sobre el porta con cualquiera de los procedimientos indicados.

A) Coloraciones nucleares

1. Carmín.

Carmines al alumbre. — 1.° Los cortes se sumergen en una de estas soluciones colorantes:

Carmín de Grenacher:

Carmín.....	2 gramos.
Solución de alumbre al 5 por 100.....	100 —

Fíltrese después de una hora de ebullición.

Carmín de Mayer (Karmalaun):

Ácido carmínico.....	1 gramo.
Alumbre.....	10 —
Agua destilada.....	200 cent. cúb.

Disolver en caliente, filtrar en frío y añadir unas gotas de formol o unos cristales de timol para que se conserve.

Cochinilla de Czokor:

Cochinilla.....	7 gramos.
Alumbre calcinado.....	7 —
Agua.....	700 —

Hiérvase hasta reducción cerca de la mitad.

Los cortes permanecerán en cualquiera de estos líquidos de seis a veinticuatro horas. Todos tienen la preciosa ventaja de no sobrecolorar.

2.° Lavado de los cortes en agua común.

3.° Inmersión de los mismos, para obtener una coloración de fondo en uno de estos dos líquidos:

Eosina.....	1 gramo.
Agua.....	1.000 —
Ácido pícrico.....	1 —
Agua.....	500 —

En cualquiera de los cuales permanecerá de cinco a diez minutos.

4.° Lavado en agua.

5.° Deshidratación en alcohol de 40°, que se mudará dos o tres veces.

6.° Aclaramiento de los cortes, si no se quiere quitar la celoidina, en creosota, esencia de bergamota o la mezcla de: xilol, 3; ácido fénico, 1.

Si conviene extraer la celoidina se usará la esencia de clavo.

7.° Colocación de los cortes en porta-objetos a favor de la paleta, y semidesecación con papel chupón o absorbente, o por simple inclinación de cristal.

8.° Montaje en bálsamo del Canadá disuelto en xilol.

Carmines alcalinos. — 1.° Los cortes sacados del agua se sumergen por quince minutos en uno de estos dos líquidos carminosos:

Carmín de Orth:

Carmín laca	2'5	gramos.
Solución saturada acuosa de carbonato de litina	100	—

Carmín borácico:

Carmín	0·5	gramos.
Borax	2	—
Agua	100	—

Cuézase la mezcla y agitando se añaden gotas de la disolución de ácido acético al 0'5 por 100, hasta que tome color rojo intenso, y fíltrese a las veinticuatro horas.

2.° Sumersión, sin previo lavado y durante medio a un minuto, en el clorhidrato de alcohol, a saber:

Ácido clorhídrico	1	gramo.
Alcohol de 36°	100	—

3.° Lavado reiterado de los cortes en agua destilada para extraer el ácido.

4.° Coloración de fondo por el ácido pícrico, según las prescripciones de la fórmula anterior, o por el carmín de índigo:

Carmín de índigo	1	gramo.
Agua destilada	100	—

donde permanecerán los cortes hasta adquirir un matiz violáceo azulado.

5.° Lavado en agua.

6.° Deshidratación en alcohol de 40°.

7.° Aclaramiento en creosota o bergamota, etc.

8.° Bálsamo en xilol.

Carmín en disolución alcohólica. — Cuando sea conveniente evitar la acción del agua, en el teñido del glucógeno por ejemplo, se empleará el *carmín ácido de Mayer:*

Carmín.....	4 gramos.
Agua.....	15 cent. cúb.
Ácido clorhídrico.....	XXX gotas.

Disuélvase en caliente y añádase:

Alcohol al 35 por 100.....	95 cent. cúb.

Fíltrese en caliente, neutralícese con amoníaco hasta que se forme un precipitado persistente y fíltrese en frío.

Los cortes permanecerán en este colorante solamente unos minutos, decolorando después con alcohol clorhídrico hasta que la diferenciación sea perfecta, y siguiendo, como en el carmín lítico, hasta su montaje.

Observaciones. — En general, conviene quitar la celoidina, pues los cortes quedan más limpios y transparentes; no obstante, si la celoidina apareciera después de la deshidratación completamente incolora, o si el objeto tuviese partes sueltas sostenidas por dicha materia, ésta debe retenerse.

Los carmines aluminosos tiñen casi exclusivamente los núcleos, fijándose de preferencia sobre las figuras mitósicas. El matiz de los cortes no es rojo, sino violáceo rojizo, por lo cual convienen las coloraciones de fondo rosa o amarillo. La fuerza colorante de estas fórmulas no es tan grande como la del carmín alcalino; así que convendrá aplicarlas señaladamente en las piezas induradas en alcohol.

El litio-carmín lleva a todos los demás colorantes la ventaja de teñir los núcleos con grande intensidad, aun en preparaciones induradas en ácido crómico, bicromatos, ósmico, etc. Otra no despreciable es que no impregna nada la celoidina, cuando se decoloran suficientemente los cortes por el clorhidrato de alcohol.

Los buenos resultados de los colorantes de fondo en las fórmulas de carmín dependen, sobre todo, de que este reactivo tiñe exclusivamente los núcleos. Por ejemplo, una bella coloración del tejido conectivo, fibras musculares, epitelio córneo, etcétera, con el carmín de índigo, sólo se conseguirá cuando el clorhidrato de alcohol haya eliminado toda la tinta roja de estas partes.

2. Hematoxilina.

La hematoxilina proporciona excelentes coloraciones nucleares, tanto más valiosas, cuanto que ponen en relieve, casi por modo exclusivo, la cromática nuclear, pero tiene dos inconvenientes: 1.°, que todas sus soluciones son inaplicables inmediatamente, exigiendo cierto tiempo (de diez a treinta o más días) para madurar; 2.°, que las coloraciones palidecen con el tiempo, al contrario de las del carmín, que se conservan indefinidamente.

Las fórmulas principales son:

Hematoxilina Böhmer.

1.er líquido.	Hematoxilina	1 gramo.
	Alcohol	10 cent. cúb.
2.° líquido..	Alumbre	20 gramos.
	Agua.....	220 —

Después de veinticuatro horas se mezclan ambas disoluciones. Debe esperarse lo menos ocho días hasta que el líquido tome color azul, y entonces se filtra. Las soluciones rojas antiguas no sirven.

Hematoxilina de Ehrlich.

1.er líquido.	Hematoxilina.....	2 gramos.
	Alcohol absoluto.....	100 cent. cúb.
2.° líquido..	Glicerina.....	100 —
	Agua.....	100 —
	Alumbre	en exceso.
	Ácido acético	10 cent. cúb.

Se mezclan y se abandona a la luz hasta que tome color rojo; entonces resulta bastante estable y tiñe bien los núcleos.

Las demás fórmulas de hematoxilina no son superiores a las precedentes, y no las mencionamos.

Modus operandi.

1.° Se sumergen los cortes sacados del alcohol en una de las soluciones de hematoxilina, previa e inmediata filtración. Aquí permanecen de dos a diez minutos.

2.° Lavado en agua destilada.

3.° Coloración de fondo con la eosina al agua o con ácido pícrico. Aquí permanecen los cortes de dos a cinco minutos.

4.° Lavado en agua.

5.° Deshidratación en alcohol de 40°.

6.° Aclaración en esencia de clavo (para quitar la celoidina que se tiñe siempre algo en violeta).

7.° Bálsamo en xilol.

Los núcleos aparecen de violeta intenso; los protoplasmas y el tejido conectivo en rosa; las materias amorfas algo moradas.

Observaciones.—La ventaja de la hematoxilina estriba en la rapidez y sencillez de su aplicación. Proporciona, además, coloraciones nucleares todo lo enérgicas que se deseen. Pero es preciso por esto mismo vigilar los cortes y moverlos continuamente, para evitar que tomen excesiva tinta o se impregnen con desigualdad. Si la coloración ha sido excesiva, decolórese con una disolución muy diluída de ácido clorhídrico y lávese después con gran insistencia o en agua con amoníaco o carbonato de litina, pues si queda algo del ácido en la preparación ésta se decolora a la larga.

Hemateína de Mayer. — Las investigaciones de P. Mayer han demostrado que la hematoxilina se descompone durante su maturación, transformándose en otro principio llamado *hemateína,* que atrae el amoníaco del aire y tiene gran afinidad por la cromatina nuclear.

Mayer da las reglas para obtener su hemateína amoniacal; pero es mucho mejor procurarse el reactivo ya preparado por la casa Grübler, de Leipzig.

La disolución de la hemateína se efectúa también en el agua aluminosa, prefiriéndose esta fórmula:

Hemateína.....	1 gramo.
Alcohol de 90°.....	50 cent. cúb.

Obtenida la solución en baño maría, añádase:

Agua.....	1.000 gramos.
Alumbre.....	50 —

Disuélvase el alumbre en caliente y déjese enfriar.

Inmediatamente después de filtrado este licor puede usarse, lográndose los mismos efectos que con la hematoxilina madura. No obstante, si hemos de juzgar por nuestra experiencia personal, nos ha parecido que la hemateína produce coloraciones nucleares menos fuertes que la hematoxilina, lo que constituye una inferioridad respecto de ésta, sobre todo cuando se usa con el método de van Gieson.

Hematoxilinas al hierro. — Además de las fórmulas indicadas y otras muchas en que se utiliza el alumbre como mordiente hay un gran número, basadas en el empleo del hierro, cobre, cromo, fósforo y los ácidos molíbdico, fosfomolíbdico, fosfotúngstico, etc., con este objeto. Como están basadas en la formación de lacas y no en la producción de la hemateína como las anteriores, no necesitan la maturación previa y ofrecen intensas coloraciones de la cromatina. Entre todas ellas destacan la clásica de Heidenhain y la rápida de Weigert.

Hematoxilina ferruginosa de Heidenhain. — 1.° Se colocan los cortes en un mordiente formado por sulfato de hierro y amoníaco al 1'5 por 100 en disolución acuosa (coloración violeta) durante media a una hora.

2.° Lavado en agua.

3.° Coloración en disolución acuosa de hematoxilina al 0'5 por 100 de media a doce horas o más.

4.° Lavado en agua.

5.° Diferenciación en el mismo alumbre de hierro amoniacal que sirvió de mordiente hasta que el corte tenga un color azul obscuro, pero transparente.

6.° Lavado en agua, deshidratación, aclaramiento y montaje en bálsamo. Se pueden obtener excelentes coloraciones de fondo con el Orange G, la picrofuchina. La disolución diluída de rojo Burdeos es aconsejada por Heidenhain para poner de manifiesto las estructuras celulares.

Hematoxilina ferruginosa de Weigert. — Se tienen preparadas dos disoluciones:

1.ª	Hematoxilina.....	1 gramo.
	Alcohol de 96 por 100.....	100 —
2.ª	Licor oficinal de sesquicloruro de hierro (1.124 de peso específico).	4 cent. cúb.
	Agua destilada.....	96 —
	Ácido clorhídrico concentrado...	1 —

En el momento de usarla se mezclan volúmenes iguales de ambas disoluciones, que toman un color obscuro, manteniéndose utilizable la mezcla un día o más, en tanto que no huela demasiado a éter, necesitando solamente unos minutos para conseguir una excelente coloración nuclear. Si la coloración es excesiva, decolórese con alcohol clorhídrico.

3. Anilinas.

Con el azul de metileno, fuchina, safranina, pardo Bismark, violeta de genciana, etc., pueden obtenerse espléndidas coloraciones nucleares, que adolecen solamente del defecto de no ser muy permanentes. Estos colores convienen especialmente en el estudio de la carioquinesis.

Como ejemplo de la aplicación de uno de estos colores, expongamos aquí el *modus operandi* del teñido con la safranina, especialmente recomendado por Flemming.

1.° Los cortes extraídos del alcohol se abandonan, por media a una hora, en una solución saturada de safranina en agua.

2.° De aquí se trasladan, uno a uno, al alcohol de 40°, ligeramente acidulado (2 o 3 gotas de ClH por 100 cent. cúb.), donde se despojarán del exceso de color. Conviene pasar los cortes por varios alcoholes, sin ácido, hasta que aparezcan de un matiz rosa algo intenso.

3.° Aclaramiento en esencia de clavo, que decolorará algo y disolverá la celoidina.

4.° Traslación de los cortes a la esencia de bergamota o de trementina, donde el color se mantendrá sin palidecer (estas esencias no disuelven las anilinas).

5.° Montaje en bálsamo seco disuelto en xilol.

Observaciones. — Se procederá casi lo mismo con las demás anilinas básicas, en soluciones al 1 o 2 por 100. Las poco solubles en agua se disolverán en mezcla de agua y alcohol.

Cuando las piezas no han sido englobadas en celoidina, no se precisa aclarar los cortes en la esencia de clavo (cuya acción decolorante hay que vigilar mucho); serán preferibles la esencia de bergamota, la de trementina, la de cedro y el xilol que respetan las anilinas.

Si la coloración de los núcleos queda pálida, ello puede provenir de varias causas: exceso de decoloración; poca permanencia de los cortes en el líquido tintóreo; escasa concentración de éste. Las más enérgicas coloraciones se obtienen con el uso de soluciones tintóreas calientes (50° a 60°).

B) Coloraciones nucleares y protoplásmicas y de las substancias intercelulares. Métodos de doble y triple coloración.

Están basados en el empleo de alguna de las coloraciones nucleares indicadas, en combinación con colores ácidos que, como es sabido, tiñen de preferencia los protoplasmas y las substancias intercelulares. Al describir los métodos utilizados en el teñido de los núcleos, hemos indicado la manera de dar coloración al fondo con la eosina y el ácido pícrico, y ahora describiremos detalladamente unos cuantos métodos, muy utilizados en histología patológica por las bellas imágenes que proporcionan:

Coloración de los cortes con el picro-carminato amoniacal. — La solución de picro-carminato, cuando actúa bien, no posee una selección muy pura sobre la cromatina, pero acentúa convenientemente los núcleos en rojo, sin rechazar las materias conectivas que impregna en rosa. El ácido pícrico colora particularmente los epitelios y fibras elásticas.

He aquí una de las fórmulas más sencillas y útiles:

Picro-carmín.

Carmín	1 gramo.
Amoníaco líquido	5 —
Agua destilada	50 —

Conseguida la disolución se añade:

Solución acuosa saturada de ácido pícrico..... 50 gramos.

El líquido se abandona al aire dos o tres semanas para que el amoníaco se evapore y se formen mohos.

Después se filtra y se añaden unas gotas de ácido fénico a saturación y queda listo para usarse.

Aplicación:

1.° Se sumergen los cortes llegados del agua, durante una hora o más, en un pocillo de porcelana que contenga picrocarmín.

2.° Lavado de los cortes en agua donde haya disueltos un poco de ácido pícrico y dos o tres gotas de ácido hidroclórico o acético.

3.° Nuevo lavado en agua con algo de ácido pícrico.

4.° Deshidratación en alcohol de 40°.

5.° Aclaramiento en esencia de clavo para extraer la celoidina, o en creosota para respetarla.

6.° Inclusión en bálsamo disuelto en xilol.

Método de van Gieson.—Este es uno de los mejores métodos de teñido introducidos en estos últimos lustros en la técnica histopatológica.

He aquí el *modus operandi:*

1.° Cortes de tumores indurados en sublimado, líquido de Flemming o alcohol, se dejan, desde cinco minutos a media hora, en una solución de hematoxilina madura (fórmula de Dielafield, Böhmer, hemateína de Mayer, etc.).

2.° Lavado rápido en agua.

3.° Los cortes se abandonan por dos o cuatro minutos en una solución saturada de ácido pícrico (1) que contenga algunas gotas de solución saturada de fuchina ácida (para un pocillo

(1) Para evitar tanteos puede usarse la solución siguiente, aconsejada por algún autor: 150 cent. cúb. de solución saturada de ácido pícrico, se mezclan a 3 cent. cúb. de solución acuosa saturada de fuchina ácida.

de porcelana de mediano tamaño, se ponen dos o tres gotas de la solución de fuchina).

En este líquido, que debe tener un color naranja vivo, el exceso de hematoxilina se disuelve y los cortes adquieren un color marrón obscuro.

4.° Lavado rápido en agua.

5.° Deshidratación en alcohol de 40° o absoluto. Aclaramiento en esencia de clavos o de bergamota. Montaje en bálsamo.

Este método, preconizado primeramente por van Gieson para el sistema nervioso, ha sido aconsejado por Ernst para ciertas neoplasias con degeneraciones hialinas, y por Kahlden (1893) para todos los tumores que contengan asociadas masas epiteliales y trama conjuntiva. En efecto, los fascículos conjuntivos destacan en rojo puro e intenso; los epitelios adquieren un tono amarillento o violado amarillento; los núcleos aparecen violados o violado azulados, y las masas de queratina antigua se muestran de color anaranjado intenso.

Dos inconvenientes tiene este bello método: 1.°, que es preciso, para que los núcleos queden bien teñidos, usar una hematoxilina madura, dotada de gran selección por los núcleos, lo que no siempre es posible; 2.°, que la intervención del ácido pícrico, del cual quedan más o menos impregnados los cortes, acaba por hacer palidecer la hematoxilina de los núcleos, resistiendo solamente la coloración roja del tejido conjuntivo y la amarillenta de los epitelios.

Por estos inconvenientes, y después de varias tentativas con varias hematoxilinas, nosotros preferimos actualmente usar como coloración nuclear el método de la hematoxilina de Martin Heidenhain o la de Weigert, combinados al de la picro-fuchina de Gieson.

Método de triple coloración con el azul de metileno en combinación con la picro-fuchina.—Este método, que nosotros usamos a menudo, da a los epitelios hermosos tonos verdes que contrastan notablemente con el rojo vivo que adquiere el tejido conectivo.

He aquí la marcha de las operaciones:

1.° Los cortes se abandonan de dos a cinco minutos, en una solución débil de azul de metileno B B (0'1 de azul y 200 de agua).

2.° Se lavan perfectamente en agua hasta que no suelten ningún color. Un lavado imperfecto produciría en el baño siguiente precipitaciones irregulares (1).

3.° Los cortes se dejan, de diez minutos a una hora, en este baño de picro-fuchina:

Fuchina ácida.....		0'1 gramo.
Agua saturada de ácido pícrico.....	100	—

4.° Lavado rápido en agua.

5.° Decoloración en alcohol absoluto y aclaramiento en xilol o bergamota. Si, bajo el examen microscópico, notáramos los protoplasmas celulares teñidos de azul o violado obscuro, se colocarán los cortes, por pocos segundos, en esencia de clavos, que arrebatará el exceso de color, y dará instantáneamente al protoplasma epitelial un hermoso color verde claro. Los cortes deben volver inmediatamente al xilol o bergamota y se montarán en bálsamo o damar disueltos en xilol.

En este método los epitelios adquieren un hermoso verde botella; los núcleos se tiñen de verde azulado intenso y el tejido conectivo toma un tono rojo vivísimo, que permite reconocer los fascículos con extraordinaria facilidad. El estroma del carcinoma y epitelioma revela claramente dos clases de haces conectivos: unos, que se tiñen pálidamente (fascículos jóvenes); otros, que se impregnan de rojo obscuro (fascículos adultos). Los músculos de fibra lisa y glándulas toman un tinte verde característico.

En el cancroide, las masas epiteliales jóvenes se coloran en verde obscuro; las que comienzan a queratinizarse toman color verde claro o amarillo puro, y los globos antiguos se presentan, ora anaranjados, ora de azul turquí. Finalmente, los fascículos musculares exhiben un color amarillo o amarillo verdoso.

En suma: este método es, por la variedad de matices que da

---

(1) Si se desea perfecta insolubilidad de la coloración azul en los baños subsiguientes pueden los cortes recién lavados ser sometidos por pocos minutos a la acción del molibdato amónico al 5 por 100 adicionado de un poco de goma arábiga.

a los diversos tejidos, un recurso excelente para casi todas las neoplasias, pero muy particularmente para el cancroide. A veces, el color de los núcleos toma un aspecto granuloso desagradable. Para evitarlo con seguridad, se tratan los cortes durante un minuto, y después de extraídos de la solución de azul y decolorados suficientemente en alcohol, por una solución de molibdato amónico al 10 por 100, y después, previo un buen lavado en agua destilada, se llevarán a la picro-fuchina.

Método de triple coloración con la fuchina o magenta, el ácido pícrico y el carmín de índigo (Cajal, 1896).

1.° Los cortes se sumergen, durante cinco a diez minutos, en una solución saturada o muy concentrada de rojo magenta (fuchina roja ordinaria).

2.° Lavado rápido en agua abundante para arrastrar el exceso de color.

3.° Coloración por cinco o diez minutos en la siguiente solución: agua saturada de ácido pícrico, 100; carmín de índigo, 0'25.

4.° Lavado rápido en agua acética (en un pocillo de porcelana lleno de agua se echan dos o tres gotas de ácido acético) adicionada de algunos cristales de ácido pícrico.

5.° Lavado rápido en agua común para descartar el exceso de ácido pícrico y evitar el tono verde del tejido conectivo.

6.° Decoloración en alcohol absoluto, hasta que los cortes hayan desprendido el exceso de magenta, lo que se conocerá en el color violado general adquirido por aquéllos. Esta decoloración es el momento más delicado del *modus operandi*, debiendo ser ejecutado en abundante alcohol, a fin de limitar su duración a pocos segundos. La insistencia en el lavado en alcohol decolora más o menos las núcleos.

7.° Aclaramiento en xilol o bergamota.

8.° Montaje en bálsamo disuelto en xilol.

Es éste sin disputa uno de los métodos mejores que se conocen para teñir todos los tumores que contienen epitelios y trama conectiva. Los núcleos aparecen impregnados enérgicamente en rojo vivo; los protoplasmas exhiben una tinta verde-clara o rosácea-amarillenta, y los haces conjuntivos se presentan de azul puro intensísimo. En los epiteliomas con globos las masas de keratina reciente adquieren color verde, mientras

que las más antiguas, es decir, las constitutivas de los focos mismos de los globos, conservan un tinte rojo rubí. Avalora además dicha fórmula la ventaja de la facilidad y rapidez de ejecución. Añadamos aún que el rojo magenta se fija en muchos microbios, impregna intensamente los *corpúsculos fuchinófilos* de Russel, y presta, en combinación con el índigo, espléndidas y variadas tintas al tejido cartilaginoso. Decolorando poco en alcohol, la trama azulada del estroma del carcinoma mostrará también en rosa fuerte las fibras de *elacina* (elastina alterada, dotada de avidez para las anilinas básicas) mencionadas por Unna en algunas lesiones de la piel.

Pueden hacerse otras combinaciones sobre la base de la coloración de la mezcla picro-índigo carminosa. Así, en vez del magenta, cabe usar la safranina, con la cual obtendremos coloraciones rojas matizadas de los condromas y de los epiteliomas pavimentosos, pues la safranina tiñe en variedad de tintas tanto la keratina como la materia fundamental cartilaginosa. Este reactivo impregna además en rojo los granos de las células cebadas de Ehrlich.

También podremos sustituir la safranina o fuchina por la vesubina (pardo Bismark), con cuyo color se obtienen bellos teñidos, en los cuales los epitelios contrastan, por su tinta pardo-amarillenta, del tono azulado-verdoso de la trama conectiva. Una pequeñísima cantidad de Bordeaux R (color rojo-caoba) adicionada al baño de vesubina, servirá para teñir en pardo-rojizo el protoplasma epitelial. También el rojo neutro proporciona bellas coloraciones nucleares en un tono pardo-naranja (1).

El citado método puede modificarse usando, en vez del color básico (magenta, safranina), el carmín borácico, el de Orth,

(1) Con el nombre de *proceder de Podwyssotzky* designan los autores un método de coloración esencialmente idéntico al tricrómico antes citado, con la diferencia de que dicho autor emplea la fuchina fenicada en vez de la solución acuosa de esta substancia (sustitución nada ventajosa y ya usada hace tiempo por nosotros), y omite el uso del agua acética. Esta omisión disminuye de seguro el poder diferenciador del azul, que no tiñe ya exclusivamente los haces colágenos.

etcétera. Con esta sustitución ha obtenido C. Calleja (1897) soberbios preparados de neoplasias. El teñido resulta sumamente sólido y duradero.

Método bibásico con la fuchina y el azul de metileno.

1.° Cortes finos se sumergen por diez minutos en esa mezcla, a partes iguales, de fuchina o magenta al 0'5 por 100, y azul de metileno B, al 0'5 por 100.

2.° Lavado rápido en agua.

3.° Inmersión por un minuto en tanino al 10 por 100.

4.° Decoloración rápida en alcohol, aclaramiento en bergamota y montaje en damar. Este es un método útil para el estudio del protoplasma de las células emigrantes del estroma de los tumores. El núcleo de los leucocitos se tiñe en violado-azul; el de las células conjuntivas, endoteliales y corpúsculos cromatófilos, de rojo; el protoplasma de estos últimos, de azul, y las fibras de elacina, de rojo.

Coloración triple con las anilinas (Biondi-Heidenhain).

Comiéncese por mezclar:

Solución saturada acuosa de *orange* ..	100 gramos.
— de fuchina ácida	20 —
Verde de metilo	50 —

Antes de usar este licor se diluye en 100 partes de agua, añadiendo ácido acético hasta que aparezca un color rojo fuerte. La aplicación se verifica en los cortes de parafina, previamente fijados en porta-objetos.

He aquí el *modus faciendi:*

1.° Inducación en sublimado a saturación y subsiguientemente en alcohol.

2.° Inclusión en parafina y fijación en porta-objetos.

3.° Coloración, por seis a veinticuatro horas, en la solución citada.

4.° Lavado rápido en alcohol al 90 por 100.

5.° Deshidratación en alcohol absoluto.

6.° Aclaramiento en xilol y montaje en bálsamo.

Este método de coloración conviene especialmente para los sarcomas y demás tejidos embrionarios. Las figuras quinéticas y el núcleo de los leucocitos se tiñen en verde violáceo; los núcleos en descanso, en azul, y los hematíes, en rojo vivo.

Método de la tionina. — Reiteradamente ha preconizado von Lenhossék (1895) para la coloración, por el método de Nissl, de los husos cromáticos del protoplasma nervioso, la *tionina*, materia colorante azul, que tiene la propiedad de descomponerse en tintas variadas en presencia de diversas substancias amorfas e inclusiones celulares. Tiene este reactivo además la virtud, ya mencionada por Jadassohn (1892) y Marschalkó (1895), de impregnar en un hermoso rojo-heliotropo los granos basófilos de las células cebadas de Ehrlich (las *Mastzellen* de este autor), corpúsculos abundantísimos en el estroma de los tumores. Pero la ventaja más valiosa de este reactivo es la gran facilidad con que se obtienen espléndidas coloraciones de la cromatina nuclear y figuras mitósicas, cualquiera que sea el líquido fijador utilizado, por lo cual apelaremos a la tionina siempre que deseemos hacer un buen estudio de los núcleos de las neoplasias.

He aquí el *modus operandi:*

1.° Cortes procedentes de tumores, indurados de preferencia en sublimado o alcohol, se someterán, por dos o más minutos, a la acción de una solución acuosa concentrada de tionina.

2.° Lavado rápido en agua.

3.° Decoloración en alcohol hasta que los cortes tomen un matiz azul claro o violado azulenco.

4.° Aclaramiento en xilol o bergamota y montaje en bálsamo disuelto en xilol. Si procedemos rápidamente, podremos también aclarar en esencia de clavos.

En general, las coloraciones de fondo no pueden hacerse sin riesgo de decolorar con exceso; no obstante, se logrará una impregnación rosa del tejido conectivo, si en vez de aclarar con xilol lo hacemos con esencia de clavos que tenga en disolución un poco de eosina o de eritrosina. Un lavado rápido de esencia de clavos incolora y la traslación inmediata al xilol o la bergamota, quitarán el sobrante de eosina y terminarán la preparación. Este modo de empleo de las coloraciones de fondo tiene la doble ventaja de quitar fuerza decolorante a la esencia de clavos y de sobreañadir, sin daño del color principal, un matiz nuevo a todo lo no impregnado.

El *método de la tionina* es excelente, aun sin coloración de fondo, para colorear el cancroide, carcinoma, fibroma, mixoma

y condroma, gracias a la variedad de tintas en que este reactivo se descompone. Así, en el cancroide tiñe los núcleos de azul intenso, los nucleolos de azul violado, los granos basiófilos de las células de Ehrlich de rojo heliotropo, de azul claro los protoplasmas epiteliales y tejido muscular, y de azul turquí casi negro las partes centrales de los globos y toda la keratina antigua. También en el condroma se descompone el reactivo en diversos matices. El azul de toluidina, muy preconizado como colorante nuclear en estos últimos años, sustituye ventajosamente a la tionina, sobre todo en la coloración de los grumos cromáticos de las células nerviosas.

Métodos de doble coloración recomendados por Heidenhain.— Un buen método de coloración de fondo de los cortes previamente teñidos en la hematoxilina de Böhmer o Delafield, es el preconizado hace algunos años por Heidenhain (1903). Recién sacados de la hematoxilina lávanse los cortes en una agua alcalina (con bicarbonato de sosa al 2 por 1.000) y se llevan a una solución alcohólica concentrada *(Congo-Corinto C* de *Congo)* o de *Benzopurpurina,* 6 B (1), colores ácidos que son atraídos por las fibras elásticas y fascículos colágenos. Al cabo de algunos minutos de teñido, se decoloran los cortes en alcohol, y se tratan por la esencia de bergamota y damar.

Este mismo autor preconiza para el teñido de los cortes que contengan fibras musculares (1913) una sucesiva coloración con colores básicos (azul de toluidina, tionina, etc.), y después con anilinas ácidas capaces de formar con los anteriores combinaciones estables*(Thiazin-roth, Thiazin braun* y *Cœrulein S.)*.

En fin, una excelente impregnación complementaria de los preparados cuyos núcleos se tiñen con carmín, fuchina o safranina, es la producida por el azul de metileno ácido (1904).

---

(1) Estos colores se venden en la fábrica antigua de *Friedrich Bayer,* hoy *Elberfelder Farbwerke.*

C) Coloraciones de las granulaciones intracelulares, inclusiones y otras estructuras protoplásmicas.

Método de Altmann. — 1.° Fijación de piezas muy frescas en una mezcla a partes iguales de bicromato potásico al 2'5 por 100 y ácido ósmico al 2 por 100 durante veinticuatro horas.

2.° Largo lavado en agua, inducración en alcoholes gradualmente concentrados, inclusión en parafina, obtención de cortes finos, pegado de los cortes en portas, disolución de la parafina por el xilol, hidratación progresiva, empleando alcoholes cada vez menos concentrados y, finalmente, introducción en agua.

3.° Teñido en caliente, de modo que se desprendan vapores sin producirse burbujas en una disolución de 20 gramos de fuchina ácida en 100 cent. cúb. de agua de anilina. Esta se prepara saturando en frío el agua con aceite de anilina y filtrando por un filtro mojado.

4.° Después de enfriar se diferencia en una mezcla de una parte de disolución alcohólica saturada de ácido pícrico y siete partes de alcohol al 20 por 100, renovando varias veces el líquido, calentado a 42° de medio a un minuto, hasta que el corte tome un color amarillo claro.

5.° Deshidratación, aclaramiento y bálsamo.

Modificación de Schride al método de Altmann. — 1.° Fijación durante veinticuatro horas en líquido de Orth, o sea líquido de Müller, con el 10 por 100 de formalina, mezclados en el momento de usarlos, porque se altera.

2.° Lavado en agua durante veinticuatro horas cambiando varias veces el agua.

3.° Diferenciación en la mezcla de éter y glicerina de Unna preparada por Grübler, poniendo unas gotas en un pocillo con bastante agua destilada, hasta que los haces colágenos aparezcan con estrías de color azul claro.

4.° Buen lavado en agua durante unos minutos.

Deshidratación, aclaramiento, bálsamo.

La granulación de las células cebadas aparecen de color rojas como la mucina y la materia amiloide, mientras que las granulaciones de las células plasmáticas se muestran azules al igual que los núcleos y las bacterias.

3.° Inmersión en ácido ósmico al 1 por 100 otras veinticuatro horas, en la obscuridad.

4.° Como el tiempo 2.° del método anterior.

5.° Teñido con la fuchina en agua de anilina de Altmann en caliente, de cinco a quince minutos.

6.° Diferenciación en el mismo alcohol pícrico.

Deshidratación, aclaramiento y bálsamo.

Lo esencial en el teñido de mitocondrias, ergastoplasma, granulaciones glandulares, etc., consiste en una excelente fijación con los líquidos dichos y otros semejantes con o sin ácido acético, y en la obtención de cortes finísimos, pudiendo emplear para teñir, además del líquido de Altmann, disoluciones de otras anilinas en agua anilinada o fenicada, la hematoxilina ferruginosa de Heidenhain, etc.

Método de Russel para los corpúsculos fuchinófilos. — 1.° Fijación en líquido de Müller, inclusión en parafina y obtención de cortes finos.

2.° Teñido en disolución saturada de fuchina en agua fenicada al 2 por 100, diez minutos.

3.° Lavado en agua durante unos minutos.

4.° Alcohol absoluto, medio minuto.

5.° Coloración contraste en:

Verde de yodo.....	1 gramo.
Agua fenicada al 2 por 100.....	100 cent. cúb.

Deshidratación, aclaramiento y bálsamo.

Los núcleos aparecen teñidos en verde y las granulaciones de Russel y las de Altmann en rojo claro.

Método del azul policromo de Unna. — Los cortes obtenidos por cualquiera de los procedimientos conocidos, son llevados a:

1.° Azul policromo de Unna preparado por Grübler, diez minutos. Este colorante puede ser preparado cociendo quince minutos 200 cent. cúb. de una disolución acuosa de azul de metileno al 10 por 100 con 10 cent. cúb. de la disolución decinormal de sosa y neutralizando exactamente después del enfriamiento con 10 cent. cúb. de la disolución decinormal de ácido sulfúrico, pero no siempre resulta bien.

2.° Lavado de algunos minutos en agua destilada.

Método de Unna-Pappenheim al verde de metilo y pironina. — 1.° Teñido de los cortes en:

Verde de metilo 00. Cristal. Amarillento (Grübler).....	0'15	gramos.
Pironina.....	0'25	—
Alcohol al 96 por 100.....	2'5	—
Glicerina.....	20	cent. cúb.
Agua fenicada al 0'5 por 100.....	100	—

donde permanece de diez a quince minutos calentando.

2.° Se enfría rápidamente y se lavan en agua varios minutos.

3.° Diferenciación con alcohol al 70 por 100, mirando con el microscopio.

4.° Rápida deshidratación, aclaramiento y bálsamo.

Los núcleos aparecen de color verde azulado, los protoplasmas de color rojo intenso.

D) Coloraciones especiales de las fibras colágenas, de reticulina y elásticas.

Método de Verocay. — 1.° Los cortes pueden ser tratados sueltos o pegados al porta, pero es preferible esto último y la hidratación debe ser progresiva y cuidadosa.

2.° Acción de un mordiente formado por disolución acuosa de ácido crómico al 1 por 100 a 46° durante diez a veinticuatro horas o más, debiendo determinar por tanteos el tiempo preferible para cada órgano, que de todos modos debe ser más largo en las piezas fijadas en formol que en las del alcohol.

3.° Abundante lavado en agua, cambiando el agua repetidas veces.

4.° **Coloración durante media a dos horas en hematoxilina** Delafield reciente.

Disolución acuosa concentrada de alumbre amoniacal.....	400 cent. cúb.
Hematoxilina (disueltos en 25 centímetros cúbicos de alcohol absoluto).	4 gramos.

Ambas disoluciones se mezclan y se tienen tres o cuatro días en la obscuridad, agitando varias veces, se filtra y se aña-

den 100 cent. cúb. de glicerina y otros 100 cent. cúb. de alcohol al 96 por 100, filtrando de nuevo. Se puede diluir para usarla en agua destilada o en disolución de alumbre al 2 por 100.

5.° Deshidratación, aclaramiento y bálsamo.

Después del teñido por la hematoxilina, se puede dar una coloración contraste con Orange G, eosina o ácido pícrico. El tanteo de la duración de la acción del mordiente debe hacerse poniendo varios cortes y sacando uno cada dos horas, hasta que las fibras colágenas se muestren con toda claridad.

Modificación de Ribbert al método de Mallory. — 1.° Introducción de los cortes en disolución acuosa de ácido fosfo-molíbdico en agua destilada al 10 por 100, con agujas de cristal, medio minuto.

2.° Lavado rápido en agua.

3.° Teñido durante veinte minutos en:

Disolución de ácido fosfo-molíbdico en agua destilada al 5 por 100...	10	cent. cúb.
Agua destilada.....	100	—
Ácido fénico cristalizado	5	gramos.
Hematoxilina.....	1'75	—

Se deja veinticuatro horas a la luz, pero funciona mejor al cabo de algunas semanas y debe ser filtrada antes de usarla.

4.° Lavado en agua, deshidratación, aclaramiento y bálsamo.

Las fibras colágenas resultan intensamente azules y otros elementos gris-verdosos.

Hüter emplea en lugar del ácido fosfo-molíbdico el ácido fosfo-wolfrámico; en la fórmula de la hematoxilina sustituye la disolución al 5 por 100 de ácido fosfo-molíbdico por la de ácido wolfrámico al 10 por 100 y diferencia con alcohol al 50 por 100, hasta que los cortes se vuelven transparentes.

Método de Mallory al azul de anilina. — 1.° Fijación en sublimado o en líquido de Zencker.

2.° Teñido con fuchina ácida en solución acuosa al 0'1 por 100 de cinco a quince minutos.

3.° Teñido durante veinte minutos, manejando los cortes con agujas de cristal o platino, en:

Azul de anilina (Grübler)	0'5 gramos.
Orange G (Grübler).....	2 —
Disolución acuosa de ácido fosfo-molíbdico al 1 por 100.....	100 cent. cúb.

4.° Alcohol de 96 por 100, cambiado varias veces dos minutos, alcohol absoluto, esencia de orégano, xilol y bálsamo.

Con esta coloración resultan en azul las fibras colágenas y de reticulina, la materia amiloide, la hialina y el moco; en rojo, los núcleos, los cilindro-ejes, la neuroglia, las fibras musculares lisas, la fibrina, la queratina y el protoplasma; en rojo-claro, las fibras elásticas, la querato-hialina y los hematíes; en rojo amarillento, la mielina.

Métodos de impregnación metálica. — También se obtienen excelentes coloraciones de los haces colágenos, de la reticulina, de los núcleos de muchas granulaciones protoplásmicas, etc., con los métodos de Bielschowsky, Cajal y Achúcarro, y sus modificaciones, para el estudio del sistema nervioso, que describiremos cuando nos ocupemos de su técnica especial, limitándonos a exponer en este sitio unas modificaciones de Río-Hortega al método de Achúcarro, por ser especialmente apropiadas para el teñido del conectivo y la reticulina.

Modificaciones de Río-Hortega al método de Achúcarro. Para el teñido de la reticulina. — 1.° Fijación en formol o alcohol, siendo útiles aun las piezas largo tiempo conservadas en estos reactivos. Cortes por congelación o en celoidina, quitando ésta de los cortes.

2.° Inmersión durante cinco minutos en solución alcohólica de tanino al 1 por 100 a 50-55°. Si la temperatura es de 40-45°, deberán permanecer los cortes de quince a treinta minutos.

3.° Antes de que se enfríe el tanino se lavan los cortes en agua solamente, el tiempo preciso para que se hidraten los cortes.

4.° En tres pocillos se colocan 10 cent. cúb. de agua destilada en cada uno y se añade 1 cent. cúb. de hidrato argéntico, preparado del siguiente modo: 30 cent. cúb. de la disolución de nitrato de plata al 10 por 100 se precipitan con 40 gotas de la disolución de sosa cáustica al 40 por 100. El precipitado obtenido se lava 10 o 12 veces con agua destilada, empleando un

litro de ésta; separada el agua del último lavado, se añaden 50 centímetros cúbicos de agua destilada y se vierte sobre ella el amoníaco preciso para redisolver el precipitado, agitándolo constantemente; añádanse 150 cent. cúb. más de agua destilada y guárdese en frasco amarillo.

Los cortes son depositados con aguja de cristal en el primer pocillo, agitando suavemente hasta que el líquido tome color amarillo, transportándolos entonces al segundo y después al tercero, donde se mantienen hasta que el líquido se torne amarillo-pálido.

5.° Se llevan a un pocillo con agua destilada, dejándolos inmóviles en el fondo, hasta que su desigual color amarillo se obscurezca y se haga uniforme en toda su extensión.

6.° Se agitan un poco en el agua y se colocan medio minuto en disolución acuosa de formol al 20 por 100, privado de su acidez mediante la creta.

7.° Lavado en agua, deshidratación, esencia de clavo y bálsamo.

Con esta variante los hilos de reticulina aparecen intensamente coloreados en pardo-obscuro o negro, resaltando con toda perfección sobre los haces colágenos de color rojizo, y las demás estructuras pálidamente señaladas.

Para el teñido de los haces colágenos. — 1.°, 2.°, 3.° y 4.° igual que en el anterior.

5.° Lavado abundante en agua.

6.° Inmersión por quince o veinte minutos en cloruro de oro al 1 por 500 a 40-45°, hasta que tomen color morado.

7.° Fijación en hiposulfito sódico.

8.° Lavado en agua, deshidratación, aclaramiento y bálsamo.

Método de Weigert para las fibras elásticas.

1.° Inducación del tejido en alcohol, formol, celoidina, etc.

2.° Coloración nuclear con litio-carmín, diferenciando con alcohol clorhídrico.

3.° Lavado en agua.

4.° Tratamiento de los cortes por veinte minutos en un color formado por precipitación de una solución de fuchina y resorcina por el percloruro de hierro. Esta solución es alcohólica y será añadida de ácido clorhídrico. Como su preparación es engorrosa, lo mejor es hacer uso del *líquido de Weigert,* prepa-

Conseguida la disolución se añade:

Solución acuosa saturada de ácido pícrico..... 50 gramos.

El líquido se abandona al aire dos o tres semanas para que el amoníaco se evapore y se formen mohos.

Después se filtra y se añaden unas gotas de ácido fénico a saturación y queda listo para usarse.

Aplicación:

1.° Se sumergen los cortes llegados del agua, durante una hora o más, en un pocillo de porcelana que contenga picrocarmín.

2.° Lavado de los cortes en agua donde haya disueltos un poco de ácido pícrico y dos o tres gotas de ácido hidroclórico o acético.

3.° Nuevo lavado en agua con algo de á cido pícrico.

4.° Deshidratación en alcohol de 40°.

5.° Aclaramiento en esencia de clavo para extraer la celoidina, o en creosota para respetarla.

6.° Inclusión en bálsamo disuelto en xilol.

Método de van Gieson.—Este es uno de los mejores métodos de teñido introducidos en estos últimos lustros en la técnica histopatológica.

He aquí el *modus operandi:*

1.° Cortes de tumores indurados en sublimado, líquido de Flemming o alcohol, se dejan, desde cinco minutos a media hora, en una solución de hematoxilina madura (fórmula de Dielafield, Böhmer, hemateína de Mayer, etc.).

2.° Lavado rápido en agua.

3.° Los cortes se abandonan por dos o cuatro minutos en una solución saturada de ácido pícrico (1) que contenga algunas gotas de solución saturada de fuchina ácida (para un pocillo

(1) Para evitar tanteos puede usarse la solución siguiente, aconsejada por algún autor: 150 cent. cúb. de solución saturada de ácido pícrico, se mezclan a 3 cent. cúb. de solución acuosa saturada de fuchina ácida.

de porcelana de mediano tamaño, se ponen dos o tres gotas de la solución de fuchina).

En este líquido, que debe tener un color naranja vivo, el exceso de hematoxilina se disuelve y los cortes adquieren un color marrón obscuro.

4.° Lavado rápido en agua.

5.° Deshidratación en alcohol de 40° o absoluto. Aclaramiento en esencia de clavos o de bergamota. Montaje en bálsamo.

Este método, preconizado primeramente por van Gieson para el sistema nervioso, ha sido aconsejado por Ernst para ciertas neoplasias con degeneraciones hialinas, y por Kahlden (1893) para todos los tumores que contengan asociadas masas epiteliales y trama conjuntiva. En efecto, los fascículos conjuntivos destacan en rojo puro e intenso; los epitelios adquieren un tono amarillento o violado amarillento; los núcleos aparecen violados o violado azulados, y las masas de queratina antigua se muestran de color anaranjado intenso.

Dos inconvenientes tiene este bello método: 1.°, que es preciso, para que los núcleos queden bien teñidos, usar una hematoxilina madura, dotada de gran selección por los núcleos, lo que no siempre es posible; 2.°, que la intervención del ácido pícrico, del cual quedan más o menos impregnados los cortes, acaba por hacer palidecer la hematoxilina de los núcleos, resistiendo solamente la coloración roja del tejido conjuntivo y la amarillenta de los epitelios.

Por estos inconvenientes, y después de varias tentativas con varias hematoxilinas, nosotros preferimos actualmente usar como coloración nuclear el método de la hematoxilina de Martin Heidenhain o la de Weigert, combinados al de la picrofuchina de Gieson.

Método de triple coloración con el azul de metileno en combinación con la picro-fuchina.—Este método, que nosotros usamos a menudo, da a los epitelios hermosos tonos verdes que contrastan notablemente con el rojo vivo que adquiere el tejido conectivo.

He aquí la marcha de las operaciones:

1.° Los cortes se abandonan de dos a cinco minutos, en una solución débil de azul de metileno B B (0'1 de azul y 200 de agua).

2.° Se lavan perfectamente en agua hasta que no suelten ningún color. Un lavado imperfecto produciría en el baño siguiente precipitaciones irregulares (1).

3.° Los cortes se dejan, de diez minutos a una hora, en este baño de picro-fuchina:

Fuchina ácida.....		0'1 gramo.
Agua saturada de ácido pícrico.....	100	—

4.° Lavado rápido en agua.

5.° Decoloración en alcohol absoluto y aclaramiento en xilol o bergamota. Si, bajo el examen microscópico, notáramos los protoplasmas celulares teñidos de azul o violado obscuro, se colocarán los cortes, por pocos segundos, en esencia de clavos, que arrebatará el exceso de color, y dará instantáneamente al protoplasma epitelial un hermoso color verde claro. Los cortes deben volver inmediatamente al xilol o bergamota y se montarán en bálsamo o damar disueltos en xilol.

En este método los epitelios adquieren un hermoso verde botella; los núcleos se tiñen de verde azulado intenso y el tejido conectivo toma un tono rojo vivísimo, que permite reconocer los fascículos con extraordinaria facilidad. El estroma del carcinoma y epitelioma revela claramente dos clases de haces conectivos: unos, que se tiñen pálidamente (fascículos jóvenes); otros, que se impregnan de rojo obscuro (fascículos adultos). Los músculos de fibra lisa y glándulas toman un tinte verde característico.

En el cancroide, las masas epiteliales jóvenes se coloran en verde obscuro; las que comienzan a queratinizarse toman color verde claro o amarillo puro, y los globos antiguos se presentan, ora anaranjados, ora de azul turquí. Finalmente, los fascículos musculares exhiben un color amarillo o amarillo verdoso.

En suma: este método es, por la variedad de matices que da

---

(1) Si se desea perfecta insolubilidad de la coloración azul en los baños subsiguientes pueden los cortes recién lavados ser sometidos por pocos minutos a la acción del molibdato amónico al 5 por 100 adicionado de un poco de goma arábiga.

a los diversos tejidos, un recurso excelente para casi todas las neoplasias, pero muy particularmente para el cancroide. A veces, el color de los núcleos toma un aspecto granuloso desagradable. Para evitarlo con seguridad, se tratan los cortes durante un minuto, y después de extraídos de la solución de azul y decolorados suficientemente en alcohol, por una solución de molibdato amónico al 10 por 100, y después, previo un buen lavado en agua destilada, se llevarán a la picro-fuchina.

Método de triple coloración con la fuchina o magenta, el ácido pícrico y el carmín de índigo (Cajal, 1896).

1.° Los cortes se sumergen, durante cinco a diez minutos, en una solución saturada o muy concentrada de rojo magenta (fuchina roja ordinaria).

2.° Lavado rápido en agua abundante para arrastrar el exceso de color.

3.° Coloración por cinco o diez minutos en la siguiente solución: agua saturada de ácido pícrico, 100; carmín de índigo, 0'25.

4.° Lavado rápido en agua acética (en un pocillo de porcelana lleno de agua se echan dos o tres gotas de ácido acético) adicionada de algunos cristales de ácido pícrico.

5.° Lavado rápido en agua común para descartar el exceso de ácido pícrico y evitar el tono verde del tejido conectivo.

6.° Decoloración en alcohol absoluto, hasta que los cortes hayan desprendido el exceso de magenta, lo que se conocerá en el color violado general adquirido por aquéllos. Esta decoloración es el momento más delicado del *modus operandi*, debiendo ser ejecutado en abundante alcohol, a fin de limitar su duración a pocos segundos. La insistencia en el lavado en alcohol decolora más o menos las núcleos.

7.° Aclaramiento en xilol o bergamota.

8.° Montaje en bálsamo disuelto en xilol.

Es éste sin disputa uno de los métodos mejores que se conocen para teñir todos los tumores que contienen epitelios y trama conectiva. Los núcleos aparecen impregnados enérgicamente en rojo vivo; los protoplasmas exhiben una tinta verde-clara o rosácea-amarillenta, y los haces conjuntivos se presentan de azul puro intensísimo. En los epiteliomas con globos las masas de keratina reciente adquieren color verde, mientras

que las más antiguas, es decir, las constitutivas de los focos mismos de los globos, conservan un tinte rojo rubí. Avalora además dicha fórmula la ventaja de la facilidad y rapidez de ejecución. Añadamos aún que el rojo magenta se fija en muchos microbios, impregna intensamente los *corpúsculos fuchinófilos* de Russel, y presta, en combinación con el índigo, espléndidas y variadas tintas al tejido cartilaginoso. Decolorando poco en alcohol, la trama azulada del estroma del carcinoma mostrará también en rosa fuerte las fibras de *elacina* (elastina alterada, dotada de avidez para las anilinas básicas) mencionadas por Unna en algunas lesiones de la piel.

Pueden hacerse otras combinaciones sobre la base de la coloración de la mezcla picro-índigo carminosa. Así, en vez del magenta, cabe usar la safranina, con la cual obtendremos coloraciones rojas matizadas de los condromas y de los epiteliomas pavimentosos, pues la safranina tiñe en variedad de tintas tanto la keratina como la materia fundamental cartilaginosa. Este reactivo impregna además en rojo los granos de las células cebadas de Ehrlich.

También podremos sustituir la safranina o fuchina por la vesubina (pardo Bismark), con cuyo color se obtienen bellos teñidos, en los cuales los epitelios contrastan, por su tinta pardo-amarillenta, del tono azulado-verdoso de la trama conectiva. Una pequeñísima cantidad de Bordeaux R (color rojo-caoba) adicionada al baño de vesubina, servirá para teñir en pardo-rojizo el protoplasma epitelial. También el rojo neutro proporciona bellas coloraciones nucleares en un tono pardo-naranja (1).

El citado método puede modificarse usando, en vez del color básico (magenta, safranina), el carmín borácico, el de Orth,

---

(1) Con el nombre de *proceder de Podwyssotzky* designan los autores un método de coloración esencialmente idéntico al tricrómico antes citado, con la diferencia de que dicho autor emplea la fuchina fenicada en vez de la solución acuosa de esta substancia (sustitución nada ventajosa y ya usada hace tiempo por nosotros), y omite el uso del agua acética. Esta omisión disminuye de seguro el poder diferenciador del azul, que no tiñe ya exclusivamente los haces colágenos.

etcétera. Con esta sustitución ha obtenido C. Calleja (1897) soberbios preparados de neoplasias. El teñido resulta sumamente sólido y duradero.

Método bibásico con la fuchina y el azul de metileno.

1.° Cortes finos se sumergen por diez minutos en esa mezcla, a partes iguales, de fuchina o magenta al 0'5 por 100, y azul de metileno B, al 0'5 por 100.

2.° Lavado rápido en agua.

3.° Inmersión por un minuto en tanino al 10 por 100.

4.° Decoloración rápida en alcohol, aclaramiento en bergamota y montaje en damar. Este es un método útil para el estudio del protoplasma de las células emigrantes del estroma de los tumores. El núcleo de los leucocitos se tiñe en violado-azul; el de las células conjuntivas, endoteliales y corpúsculos cromatófilos, de rojo; el protoplasma de estos últimos, de azul, y las fibras de elacina, de rojo.

Coloración triple con las anilinas (Biondi-Heidenhain).

Comiéncese por mezclar:

Solución saturada acuosa de *orange* ..	100 gramos.
— de fuchina ácida	20 —
Verde de metilo	50 —

Antes de usar este licor se diluye en 100 partes de agua, añadiendo ácido acético hasta que aparezca un color rojo fuerte. La aplicación se verifica en los cortes de parafina, previamente fijados en porta-objetos.

He aquí el *modus faciendi:*

1.° Inducación en sublimado a saturación y subsiguientemente en alcohol.

2.° Inclusión en parafina y fijación en porta-objetos.

3.° Coloración, por seis a veinticuatro horas, en la solución citada.

4.° Lavado rápido en alcohol al 90 por 100.

5.° Deshidratación en alcohol absoluto.

6.° Aclaramiento en xilol y montaje en bálsamo.

Este método de coloración conviene especialmente para los sarcomas y demás tejidos embrionarios. Las figuras quinéticas y el núcleo de los leucocitos se tiñen en verde violáceo; los núcleos en descanso, en azul, y los hematíes, en rojo vivo.

Método de la tionina. — Reiteradamente ha preconizado von Lenhossék (1895) para la coloración, por el método de Nissl, de los husos cromáticos del protoplasma nervioso, la *tionina,* materia colorante azul, que tiene la propiedad de descomponerse en tintas variadas en presencia de diversas substancias amorfas e inclusiones celulares. Tiene este reactivo además la virtud, ya mencionada por Jadassohn (1892) y Marschalkó (1895), de impregnar en un hermoso rojo-heliotropo los granos basiófilos de las células cebadas de Ehrlich (las *Mastzellen* de este autor), corpúsculos abundantísimos en el estroma de los tumores. Pero la ventaja más valiosa de este reactivo es la gran facilidad con que se obtienen espléndidas coloraciones de la cromatina nuclear y figuras mitósicas, cualquiera que sea el líquido fijador utilizado, por lo cual apelaremos a la tionina siempre que deseemos hacer un buen estudio de los núcleos de las neoplasias.

He aquí el *modus operandi:*

1.° Cortes procedentes de tumores, indurados de preferencia en sublimado o alcohol, se someterán, por dos o más minutos, a la acción de una solución acuosa concentrada de tionina.

2.° Lavado rápido en agua.

3.° Decoloración en alcohol hasta que los cortes tomen un matiz azul claro o violado azulenco.

4.° Aclaramiento en xilol o bergamota y montaje en bálsamo disuelto en xilol. Si procedemos rápidamente, podremos también aclarar en esencia de clavos.

En general, las coloraciones de fondo no pueden hacerse sin riesgo de decolorar con exceso; no obstante, se logrará una impregnación rosa del tejido conectivo, si en vez de aclarar con xilol lo hacemos con esencia de clavos que tenga en disolución un poco de eosina o de eritrosina. Un lavado rápido de esencia de clavos incolora y la traslación inmediata al xilol o la bergamota, quitarán el sobrante de eosina y terminarán la preparación. Este modo de empleo de las coloraciones de fondo tiene la doble ventaja de quitar fuerza decolorante a la esencia de clavos y de sobreañadir, sin daño del color principal, un matiz nuevo a todo lo no impregnado.

El *método de la tionina* es excelente, aun sin coloración de fondo, para colorear el cancroide, carcinoma, fibroma, mixoma

y condroma, gracias a la variedad de tintas en que este reactivo se descompone. Así, en el cancroide tiñe los núcleos de azul intenso, los nucleolos de azul violado, los granos basiófilos de las células de Ehrlich de rojo heliotropo, de azul claro los protoplasmas epiteliales y tejido muscular, y de azul turquí casi negro las partes centrales de los globos y toda la keratina antigua. También en el condroma se descompone el reactivo en diversos matices. El azul de toluidina, muy preconizado como colorante nuclear en estos últimos años, sustituye ventajosamente a la tionina, sobre todo en la coloración de los grumos cromáticos de las células nerviosas.

Métodos de doble coloración recomendados por Heidenhain. — Un buen método de coloración de fondo de los cortes previamente teñidos en la hematoxilina de Böhmer o Delafield, es el preconizado hace algunos años por Heidenhain (1903). Recién sacados de la hematoxilina lávanse los cortes en una agua alcalina (con bicarbonato de sosa al 2 por 1.000) y se llevan a una solución alcohólica concentrada *(Congo-Corinto C* de *Congo)* o de *Benzopurpurina,* 6 B (1), colores ácidos que son atraídos por las fibras elásticas y fascículos colágenos. Al cabo de algunos minutos de teñido, se decoloran los cortes en alcohol, y se tratan por la esencia de bergamota y damar.

Este mismo autor preconiza para el teñido de los cortes que contengan fibras musculares (1913) una sucesiva coloración con colores básicos (azul de toluidina, tionina, etc.), y después con anilinas ácidas capaces de formar con los anteriores combinaciones estables *(Thiazin-roth, Thiazin braun* y *Cœrulein S.).*

En fin, una excelente impregnación complementaria de los preparados cuyos núcleos se tiñen con carmín, fuchina o safranina, es la producida por el azul de metileno ácido (1904).

---

(1) Estos colores se venden en la fábrica antigua de *Friedrich Bayer,* hoy *Elberfelder Farbwerke.*

C) Coloraciones de las granulaciones intracelulares, inclusiones y otras estructuras protoplásmicas.

Método de Altmann. — 1.° Fijación de piezas muy frescas en una mezcla a partes iguales de bicromato potásico al 2'5 por 100 y ácido ósmico al 2 por 100 durante veinticuatro horas.

2.° Largo lavado en agua, inducración en alcoholes gradualmente concentrados, inclusión en parafina, obtención de cortes finos, pegado de los cortes en portas, disolución de la parafina por el xilol, hidratación progresiva, empleando alcoholes cada vez menos concentrados y, finalmente, introducción en agua.

3.° Teñido en caliente, de modo que se desprendan vapores sin producirse burbujas en una disolución de 20 gramos de fuchina ácida en 100 cent. cúb. de agua de anilina. Esta se prepara saturando en frío el agua con aceite de anilina y filtrando por un filtro mojado.

4.° Después de enfriar se diferencia en una mezcla de una parte de disolución alcohólica saturada de ácido pícrico y siete partes de alcohol al 20 por 100, renovando varias veces el líquido, calentado a 42° de medio a un minuto, hasta que el corte tome un color amarillo claro.

5.° Deshidratación, aclaramiento y bálsamo.

Modificación de Schride al método de Altmann. — 1.° Fijación durante veinticuatro horas en líquido de Orth, o sea líquido de Müller, con el 10 por 100 de formalina, mezclados en el momento de usarlos, porque se altera.

2.° Lavado en agua durante veinticuatro horas cambiando varias veces el agua.

3.° Diferenciación en la mezcla de éter y glicerina de Unna preparada por Grübler, poniendo unas gotas en un pocillo con bastante agua destilada, hasta que los haces colágenos aparezcan con estrías de color azul claro.

4.° Buen lavado en agua durante unos minutos.

Deshidratación, aclaramiento, bálsamo.

La granulación de las células cebadas aparecen de color rojas como la mucina y la materia amiloide, mientras que las granulaciones de las células plasmáticas se muestran azules al igual que los núcleos y las bacterias.

3.° Inmersión en ácido ósmico al 1 por 100 otras veinticuatro horas, en la obscuridad.

4.° Como el tiempo 2.° del método anterior.

5.° Teñido con la fuchina en agua de anilina de Altmann en caliente, de cinco a quince minutos.

6.° Diferenciación en el mismo alcohol pícrico.

Deshidratación, aclaramiento y bálsamo.

Lo esencial en el teñido de mitocondrias, ergastoplasma, granulaciones glandulares, etc., consiste en una excelente fijación con los líquidos dichos y otros semejantes con o sin ácido acético, y en la obtención de cortes finísimos, pudiendo emplear para teñir, además del líquido de Altmann, disoluciones de otras anilinas en agua anilinada o fenicada, la hematoxilina ferruginosa de Heidenhain, etc.

Método de Russel para los corpúsculos fuchinófilos. — 1.° Fijación en líquido de Müller, inclusión en parafina y obtención de cortes finos.

2.° Teñido en disolución saturada de fuchina en agua fenicada al 2 por 100, diez minutos.

3.° Lavado en agua durante unos minutos.

4.° Alcohol absoluto, medio minuto.

5.° Coloración contraste en:

Verde de yodo.....	1 gramo.
Agua fenicada al 2 por 100.....	100 cent. cúb.

Deshidratación, aclaramiento y bálsamo.

Los núcleos aparecen teñidos en verde y las granulaciones de Russel y las de Altmann en rojo claro.

Método del azul policromo de Unna. — Los cortes obtenidos por cualquiera de los procedimientos conocidos, son llevados a:

1.° Azul policromo de Unna preparado por Grübler, diez minutos. Este colorante puede ser preparado cociendo quince minutos 200 cent. cúb. de una disolución acuosa de azul de metileno al 10 por 100 con 10 cent. cúb. de la disolución decinormal de sosa y neutralizando exactamente después del enfriamiento con 10 cent. cúb. de la disolución decinormal de ácido sulfúrico, pero no siempre resulta bien.

2.° Lavado de algunos minutos en agua destilada.

Método de Unna-Pappenheim al verde de metilo y pironina. — 1.° Teñido de los cortes en:

Verde de metilo 00. Cristal. Amarillento (Grübler).....	0'15	gramos.
Pironina.....	0'25	—
Alcohol al 96 por 100.....	2'5	—
Glicerina.....	20	cent. cúb.
Agua fenicada al 0'5 por 100.....	100	—

donde permanece de diez a quince minutos calentando.

2.° Se enfría rápidamente y se lavan en agua varios minutos.

3.° Diferenciación con alcohol al 70 por 100, mirando con el microscopio.

4.° Rápida deshidratación, aclaramiento y bálsamo.

Los núcleos aparecen de color verde azulado, los protoplasmas de color rojo intenso.

D) Coloraciones especiales de las fibras colágenas, de reticulina y elásticas.

Método de Verocay. — 1.° Los cortes pueden ser tratados sueltos o pegados al porta, pero es preferible esto último y la hidratación debe ser progresiva y cuidadosa.

2.° Acción de un mordiente formado por disolución acuosa de ácido crómico al 1 por 100 a 46° durante diez a veinticuatro horas o más, debiendo determinar por tanteos el tiempo preferible para cada órgano, que de todos modos debe ser más largo en las piezas fijadas en formol que en las del alcohol.

3.° Abundante lavado en agua, cambiando el agua repetidas veces.

4.° Coloración durante media a dos horas en hematoxilina Delafield reciente.

Disolución acuosa concentrada de alumbre amoniacal.....	400	cent. cúb.
Hematoxilina (disueltos en 25 centímetros cúbicos de alcohol absoluto).	4	gramos.

Ambas disoluciones se mezclan y se tienen tres o cuatro días en la obscuridad, agitando varias veces, se filtra y se aña-

den 100 cent. cúb. de glicerina y otros 100 cent. cúb. de alcohol al 96 por 100, filtrando de nuevo. Se puede diluir para usarla en agua destilada o en disolución de alumbre al 2 por 100.

5.° Deshidratación, aclaramiento y bálsamo.

Después del teñido por la hematoxilina, se puede dar una coloración contraste con Orange G, eosina o ácido pícrico. El tanteo de la duración de la acción del mordiente debe hacerse poniendo varios cortes y sacando uno cada dos horas, hasta que las fibras colágenas se muestren con toda claridad.

Modificación de Ribbert al método de Mallory. — 1.° Introducción de los cortes en disolución acuosa de ácido fosfo-molíbdico en agua destilada al 10 por 100, con agujas de cristal, medio minuto.

2.° Lavado rápido en agua.

3.° Teñido durante veinte minutos en:

Disolución de ácido fosfo-molíbdico en agua destilada al 5 por 100...	10	cent. cúb.
Agua destilada.....	100	—
Ácido fénico cristalizado	5	gramos.
Hematoxilina.....	1'75	—

Se deja veinticuatro horas a la luz, pero funciona mejor al cabo de algunas semanas y debe ser filtrada antes de usarla.

4.° Lavado en agua, deshidratación, aclaramiento y bálsamo.

Las fibras colágenas resultan intensamente azules y otros elementos gris-verdosos.

Hüter emplea en lugar del ácido fosfo-molíbdico el ácido fosfo-wolfrámico; en la fórmula de la hematoxilina sustituye la disolución al 5 por 100 de ácido fosfo-molíbdico por la de ácido wolfrámico al 10 por 100 y diferencia con alcohol al 50 por 100, hasta que los cortes se vuelven transparentes.

Método de Mallory al azul de anilina. — 1.° Fijación en sublimado o en líquido de Zencker.

2.° Teñido con fuchina ácida en solución acuosa al 0'1 por 100 de cinco a quince minutos.

3.° Teñido durante veinte minutos, manejando los cortes con agujas de cristal o platino, en:

Azul de anilina (Grübler)	0'5	gramos.
Orange G (Grübler).....	2	—
Disolución acuosa de ácido fosfo-molíbdico al 1 por 100.....	100	cent. cúb.

4.° Alcohol de 96 por 100, cambiado varias veces dos minutos, alcohol absoluto, esencia de orégano, xilol y bálsamo.

Con esta coloración resultan en azul las fibras colágenas y de reticulina, la materia amiloide, la hialina y el moco; en rojo, los núcleos, los cilindro-ejes, la neuroglia, las fibras musculares lisas, la fibrina, la queratina y el protoplasma; en rojo-claro, las fibras elásticas, la querato-hialina y los hematíes; en rojo amarillento, la mielina.

Métodos de impregnación metálica. — También se obtienen excelentes coloraciones de los haces colágenos, de la reticulina, de los núcleos de muchas granulaciones protoplásmicas, etc., con los métodos de Bielschowsky, Cajal y Achúcarro, y sus modificaciones, para el estudio del sistema nervioso, que describiremos cuando nos ocupemos de su técnica especial, limitándonos a exponer en este sitio unas modificaciones de Río-Hortega al método de Achúcarro, por ser especialmente apropiadas para el teñido del conectivo y la reticulina.

Modificaciones de Río-Hortega al método de Achúcarro. Para el teñido de la reticulina. — 1.° Fijación en formol o alcohol, siendo útiles aun las piezas largo tiempo conservadas en estos reactivos. Cortes por congelación o en celoidina, quitando ésta de los cortes.

2.° Inmersión durante cinco minutos en solución alcohólica de tanino al 1 por 100 a 50-55°. Si la temperatura es de 40-45°, deberán permanecer los cortes de quince a treinta minutos.

3.° Antes de que se enfríe el tanino se lavan los cortes en agua solamente, el tiempo preciso para que se hidraten los cortes.

4.° En tres pocillos se colocan 10 cent. cúb. de agua destilada en cada uno y se añade 1 cent. cúb. de hidrato argéntico, preparado del siguiente modo: 30 cent. cúb. de la disolución de nitrato de plata al 10 por 100 se precipitan con 40 gotas de la disolución de sosa cáustica al 40 por 100. El precipitado obtenido se lava 10 o 12 veces con agua destilada, empleando un

litro de ésta; separada el agua del último lavado, se añaden 50 centímetros cúbicos de agua destilada y se vierte sobre ella el amoníaco preciso para redisolver el precipitado, agitándolo constantemente; añádanse 150 cent. cúb. más de agua destilada y guárdese en frasco amarillo.

Los cortes son depositados con aguja de cristal en el primer pocillo, agitando suavemente hasta que el líquido tome color amarillo, transportándolos entonces al segundo y después al tercero, donde se mantienen hasta que el líquido se torne amarillo-pálido.

5.° Se llevan a un pocillo con agua destilada, dejándolos inmóviles en el fondo, hasta que su desigual color amarillo se obscurezca y se haga uniforme en toda su extensión.

6.° Se agitan un poco en el agua y se colocan medio minuto en disolución acuosa de formol al 20 por 100, privado de su acidez mediante la creta.

7.° Lavado en agua, deshidratación, esencia de clavo y bálsamo.

Con esta variante los hilos de reticulina aparecen intensamente coloreados en pardo-obscuro o negro, resaltando con toda perfección sobre los haces colágenos de color rojizo, y las demás estructuras pálidamente señaladas.

Para el teñido de los haces colágenos. — 1.°, 2.°, 3.° y 4.° igual que en el anterior.

5.° Lavado abundante en agua.

6.° Inmersión por quince o veinte minutos en cloruro de oro al 1 por 500 a 40-45°, hasta que tomen color morado.

7.° Fijación en hiposulfito sódico.

8.° Lavado en agua, deshidratación, aclaramiento y bálsamo.

Método de Weigert para las fibras elásticas.

1.° Inducación del tejido en alcohol, formol, celoidina, etc.

2.° Coloración nuclear con litio-carmín, diferenciando con alcohol clorhídrico.

3.° Lavado en agua.

4.° Tratamiento de los cortes por veinte minutos en un color formado por precipitación de una solución de fuchina y resorcina por el percloruro de hierro. Esta solución es alcohólica y será añadida de ácido clorhídrico. Como su preparación es engorrosa, lo mejor es hacer uso del *líquido de Weigert,* prepa-

rado por Grübler, de Leipzig, y vendido con el nombre de *Weigert's Farblösung fur elastische Fasern.*

Este líquido, que es de color violado obscuro, se extiende sobre los cortes previamente adheridos al porta-objetos y enjugados con papel chupón. El colorante debe obrar veinte minutos. Enjúganse otra vez sin lavar y se tratan por el alcohol absoluto, xilol y damar. Según Tello, no hay inconveniente en teñir y decolorar en un pocillo de porcelana, como se hace con los procederes ordinarios, a las anilinas.

Las fibras elásticas aparecen teñidas de violado-azul, casi negro. Conviene aplicar una coloración de fondo para hacer resaltar los núcleos (método tricrómico, etc.). El proceder de Weigert da buenos resultados, tanto en los cortes de la celoidina como a los obtenidos con el microtomo de congelación.

Quien desee preparar por sí mismo el *líquido de Weigert,* procederá del siguiente modo:

Hágase desde luego esta solución:

Fuchina	1 gramo.
Agua destilada	100 cent. cúb.

Caliéntese el líquido y en plena ebullición se añadirá:

Resorcina	2 gramos.
Agua destilada	100 cent. cúb.

Vuelta a hervir en cápsula de porcelana y nueva adición de

Percloruro de hierro al 30 por 100 ...	25 cent. cúb.

Fórmase abundante precipitado. Una vez enfriado, fíltrese el líquido, aprovechándose sólo la materia detenida en el papel. El depósito, junto con el filtro, viértese en cápsula de porcelana; añádanse después 200 cent. cúb. de alcohol absoluto y vuélvase a elevar la temperatura a 100°. Se deja enfriar la mezcla, compensando el alcohol evaporado hasta completar los 200 cent. cúb., y en fin, se acaba la operación añadiendo 4 centímetros cúbicos de ácido clorhídrico. El licor resultante consérvase bien dos o tres meses.

Si en vez de fuchina se emplea la safranina para hacer el colorante, éste tiñe de rojo las fibras elásticas.

Método de Unna para las fibras elásticas.

1.° Cortes finos se sumergen en la solución siguiente:

Orceína (Grübler).....	1 gramo.
Acido clorhídrico.....	1 —
Alcohol absoluto.....	100 —

El recipiente con los cortes debe llevarse a la estufa a 30°, donde permanecerá de diez a quince minutos. El líquido se concentrará por evaporación, pero sin que llegue a desecarse.

2.° Lavado de los cortes en alcohol flojo.

3.° Lavado en agua, donde permanecerán variós minutos.

4.° Coloración de núcleos con hematoxilina.

5.° Lavado.

6.° Alcohol absoluto, esencia de bergamota y bálsamo.

Las fibras de elastina aparecen moreno-negras, y los fascículos conectivos moreno-claros. Si se desea una coloración exclusiva de las fibras elásticas, deben sufrir los cortes, antes de la deshidratación, la acción del clorhidrato de alcohol (fórmula de Orth).

CAPÍTULO VI

VIII. — Conservación de las preparaciones

BÁLSAMO DEL CANADÁ

Actualmente, apenas se emplea otra cosa que el *bálsamo del Canadá seco* disuelto en xilol en cantidad tal, que se obtenga un líquido de consistencia de jarabe espeso. La *resina damar,* disuelta también, a gran concentración, en xilol o bencina, puede utilizarse en muchos casos.

Cuando las soluciones resinosas son débiles, fórmanse burbujas de aire en los preparados, a consecuencia de desecación y retracción del vehículo.

Todo corte debe, antes de ser incluído en el bálsamo, deshidratarse en alcohol absoluto o muy fuerte, y aclararse en una esencia, que será la de clavo, cedro, bergamota, orégano, trementina o el mismo xilol.

No es indiferente la elección de una esencia. Siempre que no haya inconveniente en *disolver la celoidina de un corte, la esencia preferida será la de clavos,* por dos razones: porque aclara rápidamente, y porque no abarquilla ni retrae los cortes, aunque éstos no hayan sido deshidratados en alcohol absoluto. Para los cortes de piezas no incluídas, es decir, para las exclusivamente induradas en alcohol, será asimismo preferida.

Mas cuando *es fuerza retener la celoidina, el aclarador soberano es la creosota,* substancia que goza de tres valiosas propiedades: no arruga los cortes, transparenta rápidamente, y no disuelve la celoidina. La mezcla de xilol y ácido fénico, más atrás expuesta, es, según Weigert, igualmente recomendable. En fin, la esencia de orégano satisface plenamente este objeto.

Los cortes *teñidos con las anilinas* se aclaran en las esencias que no disuelven estos colores, a saber: la de bergamota, trementina, xilol, etc.

Su empleo exige perfectas hidrataciones en alcohol de 40°, o absoluto.

Para mayor claridad, he aquí el orden de las operaciones del montaje en bálsamo:

1.° Deshidratación de los cortes, que se pasarán, al efecto, por dos o tres pocillos de porcelana llenos de alcohol de 40°.

2.° Rápida inmersión de los mismos en esencia de clavo, creosota o bergamota, etc.

3.° Después de algunos minutos de permanencia y cuando la transparencia de los cortes sea perfecta (las manchas opacas indican presencia de agua y hay que volver a deshidratar), se trasladan a un porta objetos.

4.° El exceso de esencia se escurre del cristal, que permanecerá algunos minutos en posición oblicua. Con igual fin cabrá también superponer a los cortes papel chupón bien limpio.

5.° Montaje en bálsamo disuelto en xilol.

La *glicerina* como materia conservadora tiende a abandonarse, sucediendo lo mismo con la glicerina gelatinizada, mezcla de Farrant, líquidos salinos, etc.

Toda preparación montada en glicerina se altera tarde o temprano; por lo cual sólo debe utilizarse para estudiar tem-

poralmente ciertos preparados, cuyos finos detalles exigen, para su debida percepción, medios de menor índice de refracción que el bálsamo.

El montaje se hará poniendo el corte, sacado del agua, sobre una gota de glicerina neutra y bien pura. El cubre-objetos se rodeará de un reborde de betún de Judea o de parafina. Para dar mayor solidez, se practica, como aconseja Ranvier, una nueva concentración con solución espesa de lacre en alcohol (1).

B) Técnica especial de las lesiones generales.

CAPÍTULO VII

I. — Degeneración grasienta

Se comprueba la existencia de la grasa en las piezas, tratándolas durante algunas horas por una solución de ácido ósmico al 1 por 100, o por alguno de los líquidos que llevan ácido ósmico en su composición, líquidos de Flemming, de Marchi, etcétera. Los cortes se verifican mediante la congelación o la inclusión en celoidina y se conservan en glicerina o en bálsamo del Canadá; en este caso se evitará el empleo del xilol, que disuelve a la larga la grasa ennegrecida, deshidratando con alcohol, aclarando con benzol o esencia de bergamota y montando en bálsamo seco derretido por el calor.

Para el teñido de la grasa en los cortes deberá tenerse en cuenta que la grasa es soluble en los líquidos utilizados como

---

(1) En lugar de la glicerina se puede emplear una mezcla de

Glicerina	4 partes.
Agua	3 —
Gelatina	1 —

Se cuece y se filtra en caliente.

Esta mezcla es líquida en caliente y se solidifica al enfriarse.

disolventes de la celoidina y parafina, de modo que la fijación e induración se hará en líquidos acuosos, siendo preferible el formol al 10 por 100, y los cortes serán obtenidos con los microtomos de congelación.

El teñido puede hacerse también por el ácido ósmico al 1 por 100 o los líquidos que le contengan, haciéndolos actuar veinticuatro horas en frío o tres o cuatro horas en la estufa. Después de un lavado abundante se someterán los cortes a una acción prolongada del alcohol absoluto (varias horas), para que al ennegrecimiento primario del ácido oleico y la oleína siga el secundario de los ácidos palmítico y esteárico. De la misma manera se puede dar una segunda impregnación por el ácido ósmico a los cortes de piezas que ya fueron impregnadas en masa por dicho reactivo. Los cortes son conservados en glicerina o en bálsamo seco, como dijimos antes. La coloración de los núcleos se obtiene con la safranina, la fuchina, el carmín, etcétera.

El ácido ósmico presenta el inconveniente de teñir al mismo tiempo que la grasa la eleidina y para-eleidina, el ácido tánico y en cambio no tiñe toda la grasa, siendo preferible el empleo de los colorantes azoicos, sudan III, rojo escarlata, etc. Estas substancias pueden ser usadas, según el consejo de Fischer, disolviéndolas en alcohol de 70 por 100, hirviente a saturación, conservándolas en frascos que cierren herméticamente en estufa de 37°, y verificando las coloraciones en la misma estufa o siguiendo a Herxheimer en disolución alcohólica alcalina, que disuelve más color.

Alcohol absoluto.....	70 cent.	cúb.
Agua	10	—
Lejía de sosa al 10 por 100.....	20	—

Satúrese con la materia colorante, mejor en caliente, o la disolución acetónica, que es la preferible, saturando de la materia colorante una mezcla a partes iguales de acetona y alcohol al 70 por 100.

Tíñanse los cortes durante diez o veinte minutos en la disolución de Fischer, veinte o treinta en la alcalina y dos o tres en la acetónica; lávense rápidamente en alcohol al 50-70 por

100 y después en agua. Antes o después de la coloración de la grasa deben colorearse los núcleos por la hematoxilina. La conservación de los cortes se verifica en glicerina.

También se obtienen excelentes teñidos de la grasa empleando el sudan III con unas gotas de la disolución alcohólica saturada de rojo escarlata. Con la disolución concentrada de indofenol en alcohol al 70 por 100 durante veinte minutos, se consigue una coloración azul de la grasa, que puede ser utilizado en combinación con el carmín lítico como coloración nuclear.

Demostración de los lipoides. — Con frecuencia, en los elementos anatómicos afectos de degeneración grasienta encuéntranse en unión de las grasas neutras o sustituyendo las mezclas diversas de ácidos grasos, jabones, colesterina y sus esteres cerebrósidos, especialmente la frenosina, y fosfatidas monoamidadas, cefalina y diamidadas, esfingo-mielina. Algunas de ellas se impregnan, aunque con menos intensidad, por los métodos indicados para el teñido de las grasas neutras; pero si se quiere ponerlas de manifiesto, deberán utilizarse los siguientes procedimientos:

Método de Lorrain Smith al azul Nilo. — Consiste sencillamente en colorear cortes obtenidos en congelación de piezas fijadas en formol, durante diez minutos, en una disolución acuosa concentrada de azul Nilo, y después de un lavado rápido en agua, conservarlos en glicerina. Con este método, algo inconstante, las grasas neutras resultan rojas, los esteres de la colesterina y las mezclas de colesterina y ácidos grasos rojizos, la esfingo-mielina, la cefalina y los cerebrósidos débilmente azules y los ácidos grasos y jabones intensamente azules.

Método de Fischler (modificación del método de Benda para la demostración de las necrosis de la grasa en el páncreas). — 1.° Cortes por congelación de piezas fijadas en formol, se introducen de dos a veinticuatro horas en un mordiente formado por la disolución concentrada de acetato cúprico en agua.

2.° Lavado rápido en agua.

3.° Inmersión de veinte minutos en:

1.° Hematoxilina.....	1 gramo.
Alcohol absoluto	10 cent. cúb.

2.° Disolución acuosa concentrada de
carbonato de litina..... 1 —
Agua destilada..... 9 —

Mézclense ambas disoluciones y déjese el reactivo en reposo algunos días.

4.° Los cortes que resultan de un color negro intenso son diferenciados hasta que aparezcan de un débil color pardo amarillento y se decoloren los hematíes en:

Ferricianuro potásico..... 2'5 gramos.
Bórax..... 2 · —
Agua destilada..... 100 cent. cúb.

5.° Abundante lavado en agua, deshidratación, aclaramiento y bálsamo.

Los ácidos grasos son teñidos en azul intenso, casi negro, lo mismo que el hierro y la cal y las granulaciones eosinófilas y las de las células cebadas. Coloreando a continuación con sudan III o rojo escarlata, aparecen teñidas al mismo tiempo las grasas neutras.

Siendo solubles en formol las sales potásicas y sódicas de los ácidos grasos, si queremos verlos teñidos añadiremos a la disolución de formol empleada para la fijación el 10 por 100 de salicilato cálcico, que las transformará en sales cálcicas insolubles, y comparando cortes teñidos por el método de Fischer de piezas fijadas en formol con y sin salicilato cálcico, obtendremos una idea aproximada de la cantidad relativa de ácidos grasos y jabones existentes en el tejido.

II. — Degeneración glucógena

En la demostración del glucógeno deberá tenerse en cuenta, en primer término, su solubilidad en el agua para no emplear fijadores en que ésta sea el disolvente, debiendo preferirse el alcohol absoluto, y además que la autolisis *post morten* transforma el glucógeno en glucosa, con mayor rapidez en el hígado que en el riñón y otros órganos, pero siempre rapidísimamente, a fin de verificar la autopsia lo antes posible, colocando

inmediatamente en el fijador los trocitos que hayamos de dedicar al exámen histológico del glucógeno. La solubilización del glucógeno por saliva, aun en cortes de piezas incluídas y después de la tinción, permite diferenciar el glucógeno de la materia amiloide que ofrece reacción semejante con el yodo, y de otras substancias.

Los métodos más usados para la coloración del glucógeno, son:

Método de Ehrlich. — Cortes de piezas incluídas, mejor en parafina y fijadas en alcohol absoluto, son colocados entre porta y cubre con unas gotas de una mezcla de 100 partes de goma arábiga y una parte de la disolución de Lugol (yodo 1, yoduro potásico 2, agua 300). También pueden ser observados dichos cortes en levulosa, después de someterlos a la acción de los vapores de unos cristales de yodo en un frasco cerrado.

Método de Langhans. — Los cortes permanecen de cinco a diez minutos en el líquido de Lugol, son deshidratados en una mezcla de cuatro partes de alcohol absoluto con una parte de tintura de yodo oficinal y aclarados y conservados en esencia de orégano, naturalmente cementando la preparación con parafina y alguna laca.

Método de Best. — 1.° Fijación e inducación en alcohol alsoluto, inclusión en celoidina preferentemente y cortes.

2.° Coloración nuclear con hematoxilina.

3.° Acción desde cinco minutos a veinticuatro horas del siguiente colorante:

Carmín	2 gramos.
Carbonato potásico	1 —
Cloruro potásico	5 —
Agua destilada	60 cent. cúb.

Se cuece unos minutos, cuidando de que no forme espuma, y se añade después del enfriamiento:

Amoniaco	20 cent. cúb.

En el momento de usarlo, se mezclan 20 partes de esta fórmula de carmín con 30 partes de amoníaco y 30 partes de alcohol metílico.

4.º Diferenciación durante algunos minutos, hasta que las partes vuelvan a tomar el color azul de la hematoxilina, en una mezcla de 40 partes de alcohol absoluto, 30 partes de amoníaco y 50 partes de agua destilada.

5.º Lavado en alcohol al 80 por 100, deshidratación, aclaramiento y bálsamo.

Los núcleos aparecen azules y el glucógeno rojo. También se muestran rojas, a veces, otras substancias, como las granulaciones de las células cebadas, el protoplasma de las glándulas estomacales, el moco, la fibrina, partes decalcificadas y tejido conectivo denso.

III. — Degeneración amiloide

Aparece con la mayor claridad en cortes por congelación de piezas fijadas e induradas en formol, y una permanencia prolongada en alcohol o formol, dificulta notablemente su coloración. En las coloraciones corrientes, y sobre todo en el método de van Giesson, con el que adquiere un matiz pardo-amarillento, se puede estudiar la materia amiloide en los tejidos, pero es preferible, sobre todo cuando se trata de determinar con seguridad su naturaleza valiéndose de reacciones microquímicas, apelar a la coloración roja por el yodo o a su metacromasia con algunos colorantes de anilina.

Reacción del yodo. — Para ponerla de manifiesto pueden emplearse los mismos procedimientos que se acaban de describir para el glucógeno, recordando que la materia amiloidea no es soluble en la saliva.

Coloración con violeta de metilo. — Comienza por disolverse el color, al 1 por 100, en agua. En este líquido se dejan los cortes de tres a seis minutos; luego se lavan en agua destilada acetificada (agua, 100 gramos; ácido acético, 0'5).

El examen se practica en glicerina, donde se nota que el color violeta se ha convertido en rojizo al nivel de la materia amilácea. Con el verde de metilo, dicha substancia adquiere matiz azul claro, en tanto que los núcleos se impregnan en verde. Parecidos desdoblamientos cromáticos se logran con el violado de genciana, verde de yodo, etc.

Tienen el inconveniente estas preparaciones de no conservarse ni en bálsamo ni en glicerina. Tampoco da resultados perfectos la solución saturada de acetato de potasa que algunos preconizan.

Método de Birsch-Hirschelf. — Este autor aconseja el siguiente procedimiento de teñido con conservación subsiguiente en levulosa:

1.° Coloración de los cortes durante cinco minutos en solución alcohólica al 2 por 100 de pardo Bismark.

2.° Lavado en alcohol absoluto.

3.° Lavado diez minutos en agua destilada.

4.° Coloración, durante cinco a diez minutos, en solución de violado de genciana al 2 por 100.

5.° Lavado en agua acetificada (en un vidrio de reloj con agua, a la que se añaden 10 gotas de ácido acético).

6.° Conservación en *levulosa*. Los núcleos resultan pardos, y rojo-violeta la substancia amiloide.

Otro buen colorante es la tionina. He aquí la fórmula reciente de Kantorowick, que da preparaciones conservables:

1.° Los cortes de la celoidina se sumergen por tres o cinco minutos en solución acuosa concentrada de tionina.

2.° Se colocan en porta-objetos, se enjugan con papel secante y se decoloran y aclaran con la mezcla de: xilol, 2, y aceite de anilina, 1 (o en la de xilol, 3, y ácido fénico, 1).

3.° Esencia de bergamota y bálsamo. Los núcleos quedan azules, y la materia amiloide, rojo-heliotropo.

También el método del *carbonato de plata* amoniacal (Río-Hortega), de que hablaremos más adelante, colorea enérgicamente la materia amiloidea.

IV. — Degeneración coloidea y hialina

Pueden utilizarse todos los fijadores e indurantes descritos, y como se tiñe bien con muchos colorantes, se emplearán con éxito los métodos comunes, preferentemente el de van Gieson, con el que toma color naranja. También se tiñe en azul con el método de Weigert para la fibrina, que describiremos al ocuparnos de la sangre, pero resulta poco selectiva la coloración. Con el método de Russel para los corpúsculos fuchinófilos se tiñe en rojo.

V. — Degeneración mucosa

En la demostración de la mucina en los tejidos utilízanse dos grupos de procedimientos: uno fundado en su metacromasia con la tionina, azul de toluidina, azul de amatista y azul de metileno, y otro formado por el muci-carmín y la muci-hemateína de Mayer, que la tiñen selectivamente.

Para la utilización de los colorantes del primer grupo debe verificarse la fijación en sublimado, teniendo buen cuidado de no emplear el yodo para la extracción del sublimado, y limitándose, por consiguiente, a cambiar repetidamente el alcohol hasta que se haya disuelto el sublimado por completo. El alcohol no proporciona tan buenos resultados, pero se mejora mucho la coloración si los cortes de piezas fijadas en alcohol antes de ser teñidos se introducen de tres a cinco minutos en sublimado al 5 por 100.

El teñido con estos colorantes se verificará, según se dijo en la página 92, para la tionina, o empleando, de acuerdo con Hoyer, una disolución diluída, dos gotas de la disolución acuosa concentrada en 5 cent. cúb. de agua, durante cinco o quince minutos. Después de la deshidratación y aclaramiento, los cortes se pueden conservar en bálsamo, pero la metacromasia resalta mucho más en glicerina. Los núcleos se muestran azules, en tanto que la mucina, el cartílago, la materia amiloide y las granulaciones de las células cebadas son claramente rojos.

Método de Mayer. — Se funda en el empleo del carmín o la hemateína, mezclados con el cloruro de aluminio, que determina su fijación exclusiva sobre la mucina. Las fórmulas empleadas son:

A)

Carmín	1	gramo.
Cloruro de aluminio seco	0'5	—
Agua	2	cent. cúb.

Caliéntese dos minutos sobre una llama hasta que la pálida coloración rojiza inicial se vuelve intensamente roja, agitando a menudo, y añádase a continuación, sin dejar de agitar poco

a poco 100 cent. cúb. de alcohol al 50 por 100. Filtrada la disolución a las veinticuatro horas, se conserva perfectamente.

B)

Hemateína.....	0'2	gramos.
Cloruro de aluminio.....	0'1	—
Glicerina.....	40	cent. cúb.
Agua.....	60	—

La hemateína pulverizada se mezcla bien con dos o tres gotas de glicerina y se añade a las otras materias ya disueltas.

C) Las mismas cantidades de hemateína y cloruro de aluminio se disuelven en 70 cent. cúb. de alcohol al 70 por 100 con 1-2 gotas de ácido nítrico.

Entre las fórmulas a la hemateína, la acuosa tiñe mejor y más rápidamente, pero la segunda será empleada con ventaja cuando los cortes sean muy pegadizos.

Para el teñido se procede de la siguiente manera:

1.° Fijación en alcohol. Cortes mediante inclusión.

2.° Coloración de cinco a diez minutos en cualquiera de las fórmulas.

3.° Lavado, deshidratación, aclaramiento, bálsamo.

La mucina aparece exclusivamente teñida de rojo o azul, según que se emplee el mucicarmín o la mucihematoxilina, debiendo darse una coloración nuclear complementaria con la hematoxilina y el carmín respectivamente.

VI. — Degeneración turbia

Se puede observar en fresco, colocando en un porta con solución salina isotónica unas cuantas células obtenidas por raspado con el cuchillo o cortes en fresco mediante la congelación. Los gránulos son solubles en el ácido acético y no se disuelven en los disolventes de la grasa, ni se tiñen por los colorantes de ésta. Se impregnan bien por los métodos de Heidenhain, Benda y Altmann, pero ya se ponen de manifiesto con los métodos corrientes, y sobre todo con el de van Giesson, con el que toman un color anaranjado.

VII. — Infiltración calcárea

Cuando la cantidad de cal en forma de fosfatos y carbonatos depositada en los tejidos es grande, no necesitaremos apelar a la observación histológica y a la microquímica, para convencernos de su presencia, bastándonos el examen histológico después de la decalcificación; pero si la cantidad no es suficiente a impedir los cortes, la doble refringencia de las granulaciones observadas en fresco, su solubilidad completa en el ácido clorhídrico y nítrico con formación de burbujas e incompleta en el ácido sulfúrico produciéndose agujas cristalinas de sulfato de cal, nos indicarán su naturaleza.

Casi todos los métodos basados en el empleo del nitrato de plata, como los métodos de Cajal, de Bielschowsky y otros para el teñido del sistema nervioso, de Achucarro y del Río-Hortega para el conectivo, etc., tiñen intensamente los depósitos de cal, y lo mismo ocurre con los que utilizan sales de otros metales, plomo, cobalto, hierro y cobre. Para el uso de todos estos métodos, debe huirse del empleo de fijadores e indurantes que contengan ácidos, aunque no sean enérgicos, y se recordará que el formol es ácido y contiene ácido fórmico, debiendo evitarse una acción muy prolongada.

Método de Kossa. — Consiste en una nitratación de los cortes con ennegrecimiento mediante la luz del sol. Cortes por congelación o de piezas incluídas, se introducen de diez minutos a una hora a la luz en una disolución de nitrato de plata al 1-5 por 100, se lavan en agua, se les quita la plata excedente por inmersión en hiposulfito sódico al 5 por 100, se lavan de nuevo y se montan después de deshidratados y aclarados. Los núcleos deben ser teñidos por un colorante nuclear, preferentemente rojo, carmín, safranina, fuchina, etc.

Las coloraciones a la hematoxilina, haciendo después una intensa diferenciación para que solamente queden teñidas las partes calcificadas, ponen de manifiesto igualmente los depósitos calcáreos; sin embargo, esta propiedad la comparten con las sales de magnesia y hierro, siendo necesario para separarlas de hierro, la acción de una media hora de la disolución acuosa concentrada de ácido oxálico, hasta que el corte ya no dé la reacción azul con el ferricianuro potásico.

VIII. — Degeneración córnea

En la degeneración córnea intervienen, en primer término, la queratina, y en segundo lugar, la queratohialina en el extracto granuloso, y la eleidina en el extracto lucido.

La queratina se pone de manifiesto por apetencia, por el ácido pícrico y los colores ácidos de anilina, dando excelentes resultados el método de van Giesson. El método de Gram, modificado por Weigert, para los cortes, que describiremos en la parte bacteriológica, la tiñe de azul, y si la diferenciación se practica, según aconseja Ernst, con alcohol clorhídrico solamente, quedaría teñida dicha substancia, aunque es conveniente, teniendo en cuenta el consejo de Herxheimer, utilizar alcohol clorhídrico muy diluído.

La queratohialina se colorea también por la hematoxilina ferruginosa, por el método de Weigert, para la fibrina y por el carmín. La eleidina se tiñe con el carmín pero no por la hematoxilina, y aunque su naturaleza grasienta sea discutida, se tiñe con el ácido ósmico.

IX. — Pigmentación hemática

Tras infiltraciones sanguíneas, queda en los tejidos una materia amarillenta o morena, rica en hierro, y derivada de la hemoglobina. Semejante producto, que toma el nombre de *hemosiderina,* se reconoce por mostrar la reacción del hierro, cosa que no sucede con la melanina.

La reacción llamada del azul Berlín, se obtiene tratando primeramente los cortes por la solución al 2 por 100 de ferrocianuro de potasio algunos minutos y luego por la glicerina adicionada de un 0'5 por 100 de ácido clorhídrico. La conservación puede hacerse en glicerina o después de lavado, deshidratación y aclaramiento, en bálsamo.

También se ha preconizado, con el mismo fin, el sulfuro de amonio, que tiñe dicha materia en verde negro. Tiñendo cinco a treinta minutos con disolución concentrada y observando en glicerina con sulfuro o en bálsamo.

X. — Trastornos vasculares

En el estudio de gran número de trastornos vasculares, hemorragia, trombosis, ciertas inflamaciones, etc., juega un papel importantísimo la fibrina, que se tiñe bien con los colores ácidos de anilina, resultando de color amarillo en el método de van Giesson, pero que en muchas ocasiones conviene observar con procedimientos especiales, más demostrativos, sobre todo el

Método de Weigert. — Es una ligera modificación del método de Gram, que se describirá en la parte bacteriológica de este libro, empleando el violeta de metilo y diferenciando con una mezcla de xilol y aceite de anilina.

1.° Fijación e induración preferentemente en alcohol. También se pueden utilizar piezas fijadas e induradas en otros reactivos, pero las que provienen del formol o líquidos a base bicromato, no dan resultados constantes, a menos que no se practique con ellas una oxidación con el permanganato antes de la tinción, como indicaremos después.

2.° Cortes en congelación o con inclusión.

3.° Los cortes deben ser fijados al porta por alguno de los procedimientos descritos. También se puede realizar el método con cortes no pegados, aunque no tan perfectamente.

4.° Hidratación.

5.° Coloración contraste con litio carmín durante varios minutos.

6.° Diferenciación prolongada en alcohol clorhídrico, hasta algunas horas.

7.° Lavado abundante.

8.° Sobre los cortes pegados se hace actuar durante quince segundos el siguiente reactivo:

Aceite de anilina.....	10 cent. cúb.
Agua.....	100 —

Agítese fuertemente, y después de algunos minutos de contacto, fíltrese por un filtro mojado y añádase 11 cent. cúb. de la disolución alcohólica saturada de violeta de metilo.

Este reactivo se altera pronto, no siendo utilizable más de

dos o tres semanas, siendo preferible el preparar cada día la décima parte de la fórmula, o utilizar la mezcla de las siguientes disoluciones recomendadas por el mismo Weigert, con posterioridad:

I. Alcohol absoluto..... 33 cent. cúb.
Aceite de anilina..... 9 —
Violeta de metilo..... en exceso.

II. Disolución acuosa saturada de violeta de metilo.

En el momento de usarlas, se mezclan 3 cent. cúb. de la primera con 27 cent. cúb. de la segunda.

Si los cortes no están pegados en este tiempo como en los siguientes, se comprimen sobre el porta con un papel chupón, y en seguida se vierte sobre ellos el colorante.

9.° Se vierte el color, se seca con papel chupón y se añaden unas gotas del líquido de Lugol, o mejor disolución de yoduro potásico al 5 por 100 saturada de yodo, filtrada después de algún tiempo, de quince a veinte segundos.

10. Se vierte el líquido, se seca con papel chupón y se diferencia con aceite de anilina y xilol a partes iguales, vigilando con el microscopio hasta que el fondo esté decolorado y la fibrina aparezca de color azul.

11. Se vierte el líquido anterior, se absorbe el resto con papel chupón y se añade xilol, que es absorbido de nuevo y reemplazado por otras gotas del mismo xilol, maniobra que se repite varias veces hasta que hayamos desalojado todo el aceite de anilina.

12. Montaje en bálsamo.

Si la fijación de las piezas se verificó en formol, y sobre todo en bicromato, antes de la tinción, entre los tiempos 4 y 5, se oxidan los cortes en disolución acuosa de permanganato potásico al 1 por 100 diluída en dos volúmenes de agua, durante diez minutos, se lavan abundantemente y se llevan varios segundos a una disolución acuosa de ácido oxálico al 5 por 100, ateniéndose a lo descrito en todos los demás.

XI. — Inflamación

Se estudia fácilmente en las partes transparentes de los animales vivos, a saber: mesenterio, lengua y pulmón de la rana, expansiones membranosas de la cola del renacuajo y de la larva del sapo, mesenterio del conejo de Indias, etc.

De todos estos órganos, el más conveniente y cómodo es el mesenterio de la rana. Al efecto, debe elegirse un animal macho, a fin de evitar el ovario, que llena casi todo el abdomen de la hembra.

La inmovilización se logra inyectando bajo la piel del dorso tres o cuatro gotas de una solución de curare al 1 por 100. Al cuarto de hora, el animal queda inmóvil, sin respiración pulmonar, por lo que hay que mojarle la piel de cuando en cuando para que no cese la respiración cutánea.

Para comodidad de la observación, la rana inmovilizada se colocará sobre un cristal (9 × 12), es decir, de los llamados cuarto de placa en fotografía, en cuyo centro se adhiere con parafina un pequeño cilindro de corcho, perforado verticalmente, y biselado en su parte superior y circunferencial para alojar el intestino.

Para extraer el mesenterio, se practica en la parte lateral del abdomen una incisión, se cauteriza la herida con un escalpelo candente para contener la hemorragia, y abierto el peritoneo, se extrae un asa intestinal, que se fijará con dos o tres alfileres sobre el canal del corcho. Encima del mesenterio se coloca un pequeño cubre-objeto, a fin de aplanar la membrana, impedir la desecación y los ulteriores derrames de sangre o linfa, y facilitar el empleo de fuertes objetivos.

Los métodos especiales para las inflamaciones microbianas, van expuestos en la parte dedicada a microbiología.

XII. — Tumores

En plena autopsia podemos hacer un juicio aproximado sobre la naturaleza de los tumores que en ella se encuentren, raspando la superficie de sección con el filo del cuchillo y examinando las células extraídas en solución salina; esta observa-

ción, por disociación, permitirá en muchas ocasiones apreciar la forma de las células que constituyen el tumor mejor que los cortes.

Cuando se trate de pequeños tumores obtenidos en las autopsias o extirpados por intervenciones quirúrgicas, se verificarán todas las operaciones con la totalidad del tumor, pero en estos casos es de gran importancia hacer una precisa orientación del bloque para que sepamos siempre cuál es la superficie de implantación, cuál es la superficie libre, si la hubiera, y conozcamos seguramente la dirección en que están practicados los cortes, pues esto tiene una gran importancia para el diagnóstico en muchas ocasiones. Si los tumores son grandes, se separan trocitos, que superficialmente podrán ser muy extensos, todo lo que el microtomo consienta, pero que no deben pasar de un espesor de medio a un centímetro, según la penetrabilidad del líquido que vamos a utilizar como fijador, procurando que comprendan la región marginal, para observar la zona de transición entre lo sano y lo enfermo, zona la más favorable para el estudio. Si el tumor tuviera superficie libre, se orientará de modo que los cortes resulten perpendiculares a dicha superficie y a la de implantación.

Como fijadores pueden emplearse todos los líquidos descritos en su lugar correspondiente, aunque deben preferirse el sublimado para las coloraciones a la hematoxilina, Biondi, tionina, etc.; el formol para las que hayan de ser cortadas en congelación, procedimiento que da gran rapidez a los diagnósticos; el alcohol, que también proporciona excelentes resultados con la mayoría de los métodos. Con todos estos métodos y fijadores se obtienen magníficas imágenes de las mitosis, elemento muy interesante en el estudio de las neoplasias, pero recomendamos, en primer lugar, para este especial fin, la fijación en el líquido de Flemming y el teñido con safranina o la fijación en sublimado coloreando con el método de Heidenhain.

En el estudio de las neoplasias deben preferirse los métodos de doble y triple coloración para obtener a la par una idea clara del comportamiento de las células y del conectivo, van Giesson, varios métodos de Cajal, etc.; cuando se quiere estudiar las modificaciones del protoplasma celular, se apelará a los métodos descritos para cada una de ellas, y finalmente, en

los casos en que queramos perseguir los más finos fascículos colágenos y de reticulina, nos valdremos de los métodos a la plata, y sobre todo del de Achúcarro y sus modificaciones.

C) Técnica especial de los sistemas y órganos.

CAPÍTULO VIII

SANGRE

I.—Extracción

Aunque la sangre puede ser examinada en el interior de los vasos de los órganos recogidos durante la autopsia, la circunstancia de poseer una substancia fundamental líquida consiente su estudio rápido y completo sin necesidad a las operaciones precisas para los demás tejidos. Para ello, apelaremos en los cadáveres a la sangre contenida en el corazón y grandes vasos, a menos que circunstancias especiales nos induzcan a preferir las de otros lugares, y en los enfermos a unas cuantas gotas extraídas por punción de la yema del dedo o del lóbulo de la oreja.

Esta punción puede ser practicada con agujas especiales como la Franke (fig. 17), que es una fina lanceta armada de un largo vástago, alojada dentro de un tubo metálico compuesto de dos partes unidas a tornillo (2 y 3), disposición que permite modificar la longitud del tubo, con objeto de que la punta de la aguja sobresalga más o menos; la aguja desliza dentro del tubo con sólo tirar del botón metálico que forma su cabeza *(b)*, hasta ocultarse por completo, situación en que puede ser mantenida mediante un tope *(a)*, pero tan pronto como se quita este obtáculo, un fuerte resorte metálico la proyecta de nuevo hacia fuera y si en este momento, el extremo del tubo se apoya sobre la yema del dedo, se introducirá en ésta una porción de la aguja igual a la que hicimos sobresalir del tubo. Fuera de la posibilidad de medir con relativa precisión la profundidad del pinchazo y ocultar, a los enfermos pusilánimes y niños, la parte

punzante, estos instrumentos no ofrecen ventaja ninguna sobre las clásicas lancetas.

Antes de verificar la punción se lava el dedo cuidadosamente con éter, para aseptizarlo y desengrasarlo a la par y después de esperar un momento para que el éter se evapore, se hace la punción, procurando que sea suficientemente profunda para que las gotas se formen con facilidad, sin necesidad de exprimir el dedo, lo que modifica la composición histológica de la sangre; por esta misma razón se prescinde de la primera gota

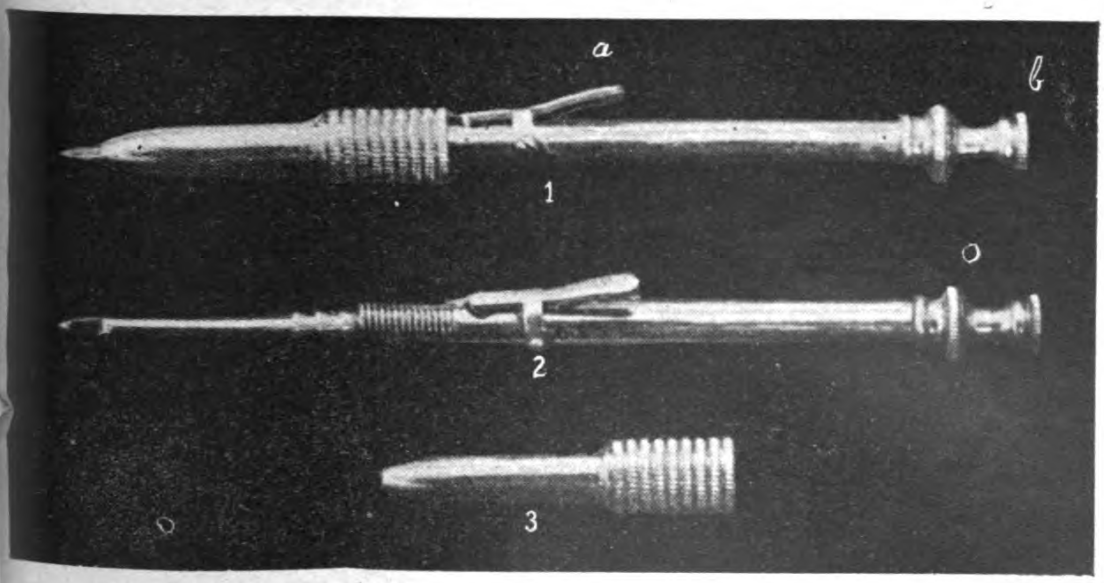


Fig. 17. — Aguja de Franke para la extracción de sangre. — 1, aguja completa; 2, vástago interior; 3, cubierta atornillable para reglar el pinchazo.

que al salir ha arrastrado algo de linfa, quitándola con un paño y dejando que se forme otra. También se debe prescindir de todas aquellas que comiencen a coagularse por el tiempo transcurrido en las distintas manipulaciones. Si no hemos terminado el análisis y llega un momento en que no se forman más gotas, a pesar del lavado repetido del dedo y de ligeras expresiones, en vez de insistir en éstas, debe hacerse una nueva punción. Terminada la operación, lávese simplemente el dedo; la hemorragia cesa con espontaneidad y sólo en casos excepcionales será preciso ocluir la picadura con colodion.

II.—Examen cuantitativo de sus elementos

Se verifica con el hematímetro de Thoma (fig. 18), que consta de dos pipetas capilares calibradas (fig. 19), con uno de los extremos apuntado para sumergirlo en la gota de sangre y el otro ensanchado primero en forma de ampolla y después estrechado de nuevo hasta recobrar el espesor de la pipeta, que sirve de implantación al tubo de goma que utilizaremos en la aspiración. La relación entre la capacidad de la ampolla y la del tubo en la pipeta destinada a los hematíes es de 100 a 1,

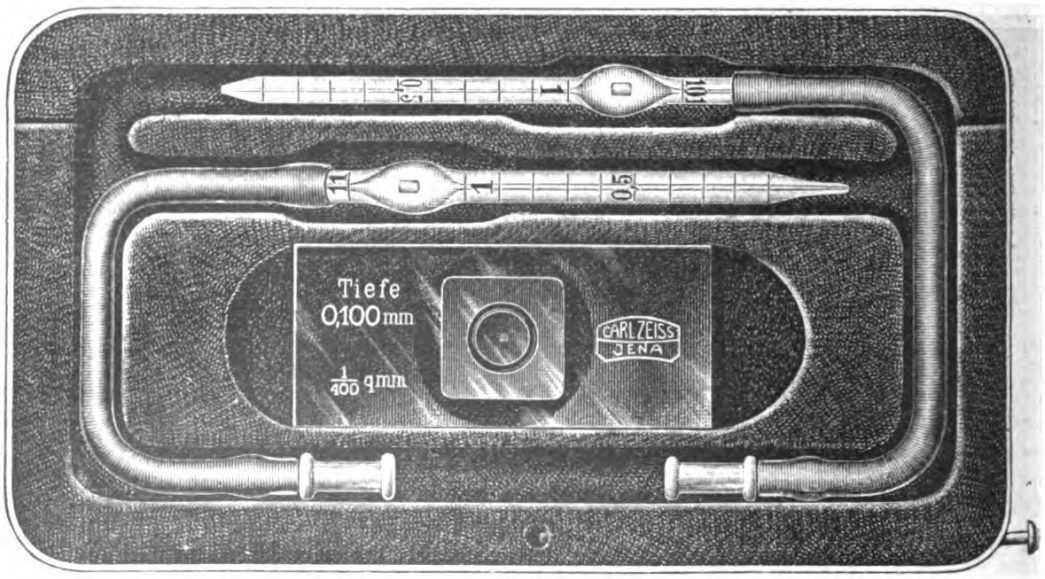


Fig. 18.—Aparato numerador de los glóbulos, según Thoma, puesto en su estuche. Consta de una célula porta-objetos calibrada y de dos mezcladores, uno para diluciones al 1 por 10 y el otro para diluciones al 1 por 100.

y en la otra, especial para los leucocitos, de 10 a 1, como se ve en las cifras escritas en cada una. Dentro de cada ampolla existe una esferita de cristal, que facilita la emulsión de los glóbulos.

Contiene además una cámara calibrada, formada por un grueso porta-objetos (fig. 20) que muestra en su centro una cavidad circular de 0'1 milímetro de altura; en el fondo de ésta hállase grabado un retículo formado por el encuentro de líneas

perpendiculares equidistantes (fig. 21), de modo que la superficie total del retículo es de 1 milímetro cuadrado; cada lado resulta partido en 20 partes iguales y dentro del milímetro cuadrado aparecen inscritos 400 cuadraditos.

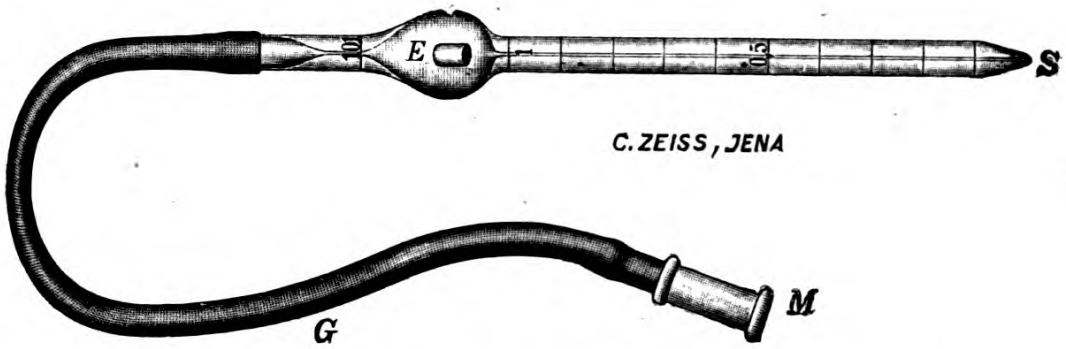


Fig. 19.—Detalles del capilar mezclador.—S, punta por donde se absorbe el líquido; E, cámara donde se hace la mezcla de sangre y líquido indiferente; G, tubo de goma; M, extremo destinado a la succión.

La determinación cuantitativa básase en colocar en la célula una gota de una dilución de sangre, verificada por medio de las pipetas, cubrirla con un cubre-objetos espeso que limite la

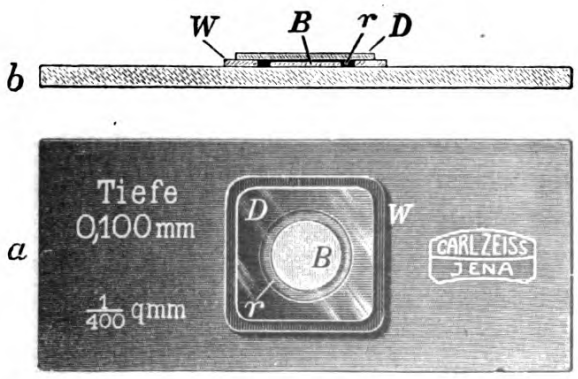


Fig. 20.—Detalles de la célula calibrada.—*a*, vista de frente; *b*, vista en sección.

cavidad, y después de esperar algunos minutos para que los glóbulos se sedimenten, contarlos, refiriendo la cantidad hallada al milímetro cúbico. Esto realízase de modo algo diferente en los hematíes y en los leucocitos.

Numeración de los hematíes. — Para la dilución de la sangre empléase el líquido de Hayem

Bicloruro de mercurio.....	0'4	gramos.
Sulfato sódico.....	5	—
Cloruro sódico.....	1	—
Agua destilada.....	200	cent. cúb.

o la disolución de cloruro sódico al 0'9 por 100.

Se introduce la punta de la pipeta correspondiente en la gota de sangre, y aspirando suavemente por el extremo del tubo de goma, se hace que la sangre ascienda por el tubo capilar hasta la división 0'5, si se trata de una sangre poco alterada en el número de sus hematíes, o hasta el 1 en casos de anemia intensa, teniendo gran cuidado en que no resulte dividida la columna por burbujas o penetren pequeños coágulos; si ocurre esto, viértase soplando la sangre introducida, lávese la pipeta con el líquido de la dilución, alcohol y éter, y después de secar comiéncese de nuevo. Una vez que hemos tomado la cantidad de sangre indicada, se limpia la punta con cuidado, e introduciéndola en el líquido de Hayem se vuelve a aspirar para que penetre en la ampolla la sangre seguida del líquido, haciendo girar gradualmente la pipeta para evitar la formación en el líquido a medida que entra en la dilatación, hasta llegar a la señal 101. En seguida se ocluyen con los dedos las dos aberturas de la pipeta, e imprimiéndola rápidos movimientos de vaivén, se hace que los glóbulos se repartan uniformemente, lo que se consigue en dos o tres minutos; con unos cuantos ensayos se adquiere la pericia necesaria para verificar todas estas operaciones con la suficiente rapidez para que la sangre no comience a coagularse en el interior de la ampolla y, por tanto, resulte imposible su perfecta repartición. Hecha la dilución se sopla por el tubo de goma con suavidad, se desprecia la primera gota que se forma en la punta, porque contiene el líquido que quedó dentro del tubo y, por consiguiente, no se pudo mezclar, y formando una segunda o tercera gota, se la deposita en el centro de la cámara; a continuación se cubre la cámara con el cubre apoyándolo sobre el porta por uno de los lados y dejándolo caer con lentitud para evitar que se formen burbujas. Si esta operación ha sido bien practicada, comprimiendo fuerte-

mente el cubre sobre el porta en las partes sólidas, es decir, por fuera de la célula, hasta que se formen los anillos coloreados de Newton, por la perfecta adaptación; resultará completamente llena de sangre la parte central de la cámara, sin ninguna burbuja y quedará libre de sangre por completo el surco que rodea la célula. Si la gota era demasiado grande rebasa el surco al colocar el cubre y se intercala entre el porta y el cubre falseando la altura de la cámara y, por consiguiente, los resultados obtenidos, a menos que la aparición de los anillos coloreados sea perfecta; si la cantidad es escasa se forman burbujas con facilidad y además también se falsea la distribución de los hematíes; en todos estos casos debe prescindirse de lo hecho y después de limpiar la cámara con esmero volver a comenzar con una nueva gota.

Montada la cámara de esta manera se la deja reposar durante algunos minutos para que los hematíes se depositen en el fondo por la acción de la gravedad, antes de comenzar a contar. Se la coloca en la platina del microscopio de modo que el retículo quede en el centro, mirando con un objetivo de poco aumento, observando al mismo tiempo si es uniforme el reparto de los glóbulos, y se cuentan los hematíes con otro de mayor amplificación, pero de longitud focal suficiente para el espesor del cubre, el D de Zeiss o alguno de los especiales que para este objeto construyen diferentes fabricantes.

Valiéndose de los movimientos de la platina o de una platina móvil si aquélla no lo fuera, o en último caso de los movimientos impresos por la mano, que llegan a adquirir gran regularidad con la repetición, se cuentan los hematíes contenidos en una fila de 20 cuadraditos (fig. 21), de izquierda a derecha, computando como de la fila todos los que toquen las líneas de separación superior, reservando los que toquen la línea inferior para la fila siguiente; anotada la cifra obtenida, se cuenta una nueva fila, y de este modo hasta 10; sumadas todas las cifras obtenidas, para hallar la cifra correspondiente al milímetro cúbico basta efectuar la siguiente operación:

Cifra obtenida, x 2 (relación de la superficie contada al milímetro), x 10 (relación de la altura de la célula al milímetro), x 200 (título de la dilución si se tomó 0'5 de sangre con la pipeta) = Cifra obtenida, x 4.000.

Claro es que el conocimiento de las dimensiones de la cámara permite el que cada operador haga los cálculos como crea más cómodo, pero debemos advertir que éstos resultarán tanto más perfectos cuanto mayor sea la superficie contada, pues si el error cometido contando como hemos dicho resulta multiplicado por 4.000, y por consiguiente despreciable ya que trabajamos con millones de glóbulos en milímetro cúbico, no contando más que un cuadradito, el error resultaría multiplicado por 800.000 y, por consiguiente, casi inservible todo lo hecho.

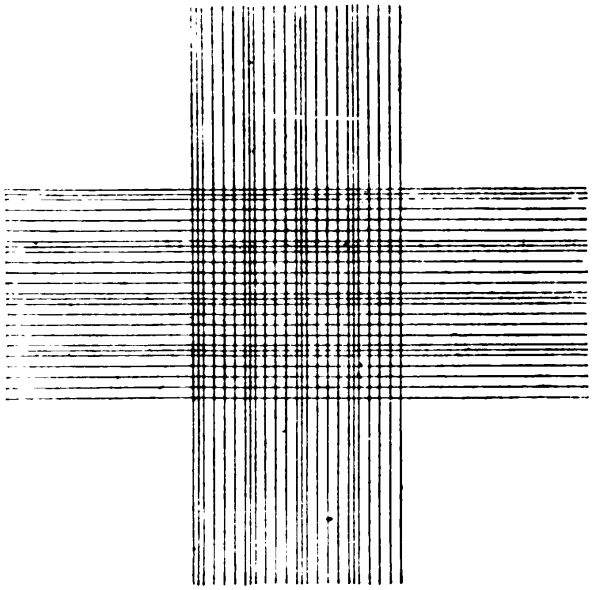


Fig. 21. — Retículo de Thoma para el recuento de glóbulos rojos (aumento, 20 diámetros).

Numeración de los leucocitos. — La dilución se efectúa en el líquido de Türck, que es una mezcla de ácido acético glacial y agua al 1 por 100, a la que se añaden unos cristalitos de violeta de metilo, para que resulte débilmente teñida de violeta; en este líquido los hematíes se decoloran, y como al mismo tiempo la cromatina del núcleo de los leucocitos resalta más y se tiñe ligeramente, se facilita muchísimo la observación y la numeración.

Teniendo en cuenta todas las observaciones que acabamos de hacer con relación a los hematíes, se llena la pipeta desti-

nada a los leucocitos hasta el número 1 y se absorbe a continuación el líquido de Türck hasta el número 11, se ocluyen las extremidades y se agita dos o tres minutos; se desprecia la primera gota y se pone una segunda en la cámara, tapándola con el cubre; después de un reposo de varios minutos se procede a la numeración contando todos los leucocitos existentes en el milímetro cuadrado o sea en todo el retículo.

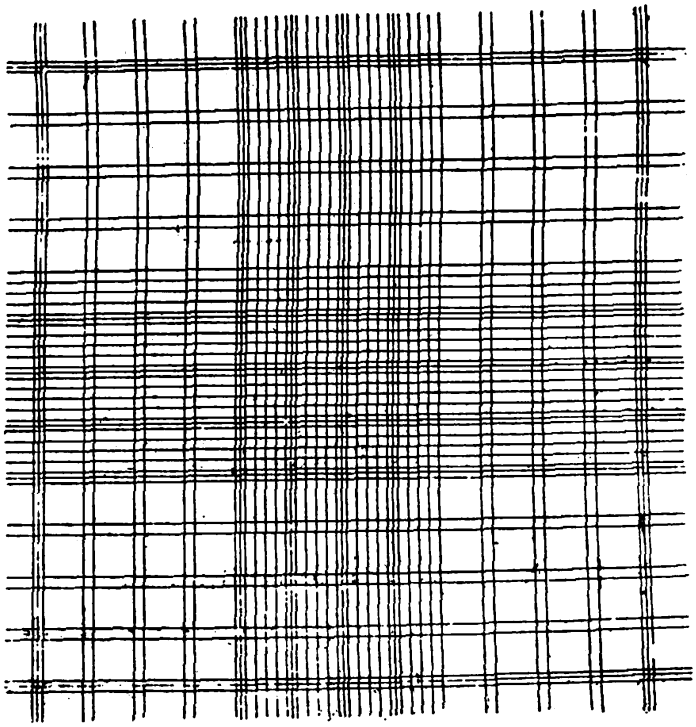


Fig. 22. — Retículo de Türk para el recuento de glóbulos blancos (aumento, 20 diámetros).

La siguiente operación nos dará el número de leucocitos por milímetro cúbico.

Cifra obtenida, x 10 (relación de la altura de la célula al milímetro) x 10 (título de la dilución) = Cifra obtenida, x 100.

Con objeto de aumentar el número de leucocitos contados, disminuyendo por consiguiente los errores, se han ideado cámaras especiales que poseyendo en su centro un retículo semejante al de la célula de Thoma, o poco modificado, cortan las líneas prolongadas por otro cuadrado más grande que encierra una superficie igual a 9 milímetros cuadrados, pudiéndose con-

tar una cantidad de leucocitos nueve veces mayor; entre ellas mencionaremos las de Zuppert, Elzholz y Türck (fig. 22).

Limpieza de los instrumentos. — Una vez verificada la numeración de glóbulos se limpian las pipetas haciendo pasar por ellas en uno y otro sentido, primero agua, después alcohol, y por último, éter; si se han formado coágulos se quitarán por medio de la lejía de potasa, teniendo buen cuidado de que el lavado posterior con agua sea perfecto. La limpieza de la cámara debe verificarse solamente con agua, porque el alcohol y el éter disuelven el cemento; si se formaran coágulos, quítense con una lejía de potasa muy diluída.

Después de cada operación los instrumentos deben quedar completamente limpios y secos; en caso contrario se depositan rápidamente suciedades que alteran el calibre de los tubos y falsean por completo los resultados obtenidos, quedando inservibles los aparatos.

Observaciones. — Cuando la numeración de glóbulos no se practica al lado del enfermo y hay que transportar la sangre al laboratorio, es necesario verificar las diluciones inmediatamente después de la extracción de la sangre y transportar las diluciones hechas, para lo cual basta el quitar con cuidado las gomas de aspiración de las pipetas y ocluir éstas con gomas acintadas gruesas, como las que sirven para mantener cerradas las carteras de bolsillo, estiradas entre los dos extremos. A pesar de las mayores precauciones, con frecuencia se marcha la sangre de las pipetas, por lo cual resulta mucho más práctico el verter las diluciones hechas mediante la pipeta en tubos de cristal, perfectamente cerrados con tapón de goma, para evitar la evaporación del líquido, y una vez en el laboratorio, después de agitar para volver a homogeneizar la mezcla, se toman directamente de ellos las gotas necesarias. Naegeli aconseja el transporte de las cámaras ya preparadas en estuche en que cada instrumento resulte sujeto con firmeza. El hematímetro de Bürker contiene, además de las pipetas, dos frasquitos con tapón de goma para el transporte de las diluciones hechas, y su cámara contiene, en un mismo porta, dos retículos: el de Thoma para hematíes y otro de Bürker para leucocitos.

Numeración de las plaquetas. — De ordinario no se practica;

basta con la observación de las preparaciones frescas de sangre y de las teñidas para obtener una idea suficiente sobre su comportamiento, mas si se quiere tener la cifra con mayor exactitud, tendremos en cuenta la rapidez con que se deforman en cuanto salen de los vasos, para hacer el pinchazo a través de una gota de una disolución de sulfato magnésico al 14 por 100, que aunque no evita por completo la deformación impide que se conglomeren; una vez que se forme la gota mezcla de sangre y líquido conservador, se hace la cuenta utilizando la pipeta para hematíes y la disolución de sulfato magnésico como líquido de dilución con una pequeñísima cantidad de violeta de metilo, según aconseja Sahli, a fin de que las plaquetas teñidas sean más fácilmente perceptibles. Contando el número de hematíes y el de plaquetas se obtiene la relación existente entre ambas, y si después hacemos la numeración de hematíes aisladamente, según acabamos de describir, deduciremos el número absoluto de plaquetas.

Método de Wright para contar las plaquetas.— Consiste en diluir la sangre al 1 por 100 mediante la pipeta de hematíes con

Cianuro potásico al 1 por 1.400.....	3 partes.
Disolución acuosa de Brillant Cresyl-blau al 1 por 300.....	2 —

La mezcla de ambas soluciones debe hacerse inmediatamente antes de su uso y la disolución de cianuro no se conserva más de diez días. La otra se conserva indefinidamente con tal de que se evite la formación de levaduras.

Una vez hecha la dilución, se coloca en el hematímetro como la de los hematíes y después de esperar de diez a quince minutos para que las plaquetas se depositen en el fondo, se cuentan como aquéllos. Las plaquetas aparecen como corpúsculos claramente contorneados, redondos, ovales o alargados, teñidos de color lila; los hematíes se han decolorado y los leucocitos muestran el núcleo teñido en azul obscuro y el protoplasma azul pálido.

III. — Examen cualitativo de sus elementos formes

a) En fresco. — Una gota de sangre colocada entre porta y cubre, permite obtener una porción de datos interesantes en el corto espacio de tiempo en que se verifica su coagulación.

Veremos las variaciones de volumen de los hematíes, sus deformaciones y su contenido en hemoglobina; los veremos disponerse en columnas si el espesor del preparado lo consiente; distinguiremos perfectamente los leucocitos y su relación aproximada con los hematíes; observaremos con claridad algunas de las modalidades leucocitarias, como los eosinófilos provistos de gruesas granulaciones brillantes, los neutrófilos con granulaciones finas y sin brillo, los linfocitos por su menor tamaño, y el núcleo que rellena casi por completo la célula, y los mononucleares grandes por su tamaño y el polimorfismo de su núcleo; finalmente asistiremos a la formación de la fibrina, juzgando aproximadamente de su cantidad.

Sobre todo de alguno de estos caracteres, como la morfología de los hematíes, obtendremos una idea más exacta en las preparaciones en fresco que en las extensiones, donde fácilmente pueden deformarse, recomendando que no se prescinda nunca de este examen. Cuando no se posea pericia suficiente, conviene comparar la sangre que se examina con otra seguramente normal.

b) En extensiones coloreadas. — **Preparación de las extensiones.** — Consiste en la formación de una tenue capa de sangre en la superficie de portas o cubres, en la que los glóbulos no estén superpuestos ni se toquen, y, merced a la rapidísima desecación, se evite todo cambio de forma.

Para verificar las *extensiones sobre porta,* se toca con el porta-objetos una gota de sangre recién formada, de modo que se deposite una pequeña gota, no en el centro, sino en la unión de su tercio medio con uno de los extremos, inmediatamente se apoya sobre la misma cara el borde menor de un porta esmerilado, perpendicular a la dirección del porta en que vamos a practicar la extensión por dentro de la gota, de modo que se forme un ángulo diedro, en cuyo seno se corre la sangre tan pronto como es tocada por el porta que nos sirve para exten-

der; una vez que la sangre ocupa una porción mayor o menor de la arista del ángulo diedro, se desliza el porta extendedor por la superficie del otro con movimiento uniforme (fig. 23), desde donde está la gota hasta el extremo más distante, marchando siempre el cristal por delante de la sangre; en cuanto se ha terminado se imprime a la extensión efectuada, un rapidísimo movimiento de vaivén, para que la desecación sea casi instantánea.

Para obtener buenas extensiones sobre porta, es preciso: 1.° Que los cristales estén bien limpios y desengrasados, a fin de que la sangre se adhiera; si los portas son nuevos, basta

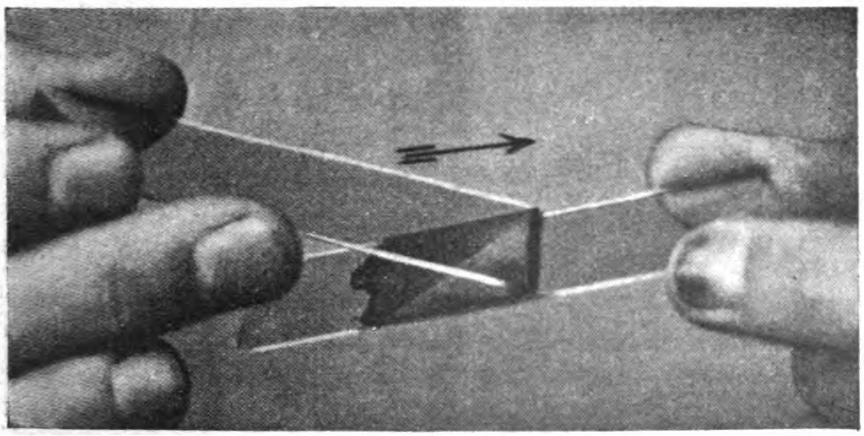


Fig. 23. — Modo de hacer las extensiones en porta-objetos. La flecha indica la dirección del movimiento.

limpiarlos con un paño de hilo fino recién lavado, si han sido ya usados o aunque nuevos están engrasados, será forzoso apelar al procedimiento de limpieza que indicaremos al ocuparnos de la coloración simple de los microbios. 2.° Que sean planos, pues si no lo son falta la adaptación de los dos cristales y la extensión resulta muy desigual e imposible en algunas ocasiones. 3.° Que el movimiento de los dos cristales al extender sea uniforme, porque dependiendo el espesor de la capa de la rapidez con que se verifica la extensión, en los sitios en que ésta haya sido rápida, la capa será fina y lo contrario ocurrirá en los lugares en que hayamos procedido con lentitud.

La composición de la sangre también ejerce una influencia

grande en la perfección de las extensiones; las sangres demasiado pobres en leucocitos, así como las demasiado ricas (leucemias) se extienden mal y lo mismo ocurre en los casos de anemias profundas. Repitiendo las operaciones siempre será posible la obtención de extensiones que sin ser perfectas sean suficientes para su estudio.

La extensión sobre cubre se verifica también con facilidad; con un cubre limpio cogido con los dedos por uno de sus ángulos, se toca la gota de sangre recién formada, de modo que quede una pequeña gota en el centro de una de sus caras; en seguida, cogiendo otro cubre igualmente por uno de sus ángulos, se superpone sobre el anterior de modo que los ángulos de éste correspondan al centro de los lados de aquél (fig. 24), se deja que la sangre se extienda entre los dos cubres por capilaridad sin ejercer la menor presión; una vez bien extendida la sangre, se separan ambos cubres tirando de ellos en opuesto sentido y en el mismo plano para evitar presiones, y así que están separados se mueven rápidamente en el aire para que la desecación sea casi instantánea.

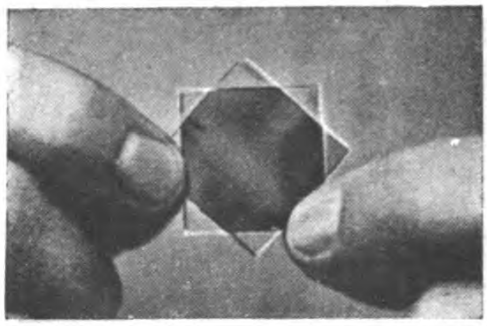


Fig. 24. — Modo de hacer las extensiones en cubre-objetos.

La extensión sobre cubre tiene la ventaja de la mayor facilidad en el transporte y en la conservación de extensiones, evitando las dificultades que en ocasiones presenta el hallazgo de portas bien planos; mas en cambio exige siempre el empleo de los dos cristales, porta y cubre, y siendo estos últimos difícilmente manejables en su limpieza, con rareza pueden ser utilizados más de una vez, encareciéndose de este modo el trabajo, mientras que con los portas esto no ofrece la menor dificultad; así es que pudiendo hacerse igualmente perfectas las extensiones con las dos clases de cristales, fuera de aquellos casos en que se trata de hacer preparaciones para conservar en la colección, deben utilizarse los portas.

Fijación de las extensiones. — Los fijadores preferentemente utilizados en hematología, son:

Alcohol metílico.....	de 3 a 5 minutos.
— etílico absoluto.....	de 20 a 30 —
— absoluto y éter a partes iguales.....	de 10 a 30 —

Cuando las extensiones se han hecho sobre cubre, basta introducir los cristales en pocillos que contengan los líquidos fijadores que acabamos de enumerar, pero si las hicimos en porta, dispondremos éstos horizontalmente sobre pocillos y echaremos sobre la estría unas cuantas gotas del fijador, teniendo cuidado de que no falte líquido en todo el tiempo que debe durar la fijación, para lo cual repondremos tantas veces como sea preciso el líquido y además dificultaremos la evaporación cubriendo el preparado con campanas de cristal.

La fijación por el calor, muy utilizada en las coloraciones con el triácido de Ehrlich, se obtiene calentando a unos 120° durante una o dos horas; antes se recomendaba hacer el calentamiento en estufa, pero basta disponer de una platina de Malassez, de Adnet (fig. 16) o de una simple chapa metálica, que se calienta por uno de los extremos, para que el calor se distribuya por el resto de la placa; por un ligero tanteo con gotas de agua se averigua el punto en que existe la temperatura de 120° aproximadamente, pues si la temperatura es superior, al caer la gota adoptará el estado esferoidal, y si la temperatura es inferior hasta 100°, hervirá. Colocando las extensiones entre ambos puntos, estarán sometidas a la temperatura necesaria.

Coloración de las extensiones. — Podemos clasificar los métodos de coloración en dos grupos, formado el primero por los que tiñen casi todos los elementos de la sangre y proporcionan excelentes imágenes de conjunto, y el segundo por los que colorean solamente determinados elementos o ciertas granulaciones.

A) Métodos generales de coloración.

Para la aplicación de los líquidos colorantes emplearemos procedimientos semejantes a los que acabamos de indicar para la aplicación de los fijadores, es decir, que cuando utilicemos extensiones sobre portas, verteremos unas cuantas gotas del color sobre la extensión, pero como las materias llevan con gran frecuencia precipitados que se depositan sobre la estría, siendo muy difícil después el quitarlos por completo, será buena costumbre la filtración de todos los líquidos colorantes que empleemos, o por lo menos aquellos que los produzcan más frecuentemente. Cuando sea imposible la filtración, como pasa, por ejemplo, con el líquido de Giemsa, se dispondrán los portas invertidos sobre placas de Petri o cristalizadores, elevándolos del fondo de la vasija mediante otros portas o varillas de vidrio que les sirvan de apoyo en los extremos y se vierte la materia colorante de modo que se extienda entre el fondo de la vasija y el porta invertida, estando, por consiguiente, en contacto con la estría. Las extensiones en cubre se tiñen colocando los cubres invertidos sobre la superficie del color contenido en pocillos, con cuidado para que se mantengan en la superficie.

Los métodos generales más usados son los siguientes:

Hematoxilina-eosina. — 1.° Fijación en alcohol metílico o etílico absoluto.

2.° Teñido durante tres a cinco minutos con la disolución alcohólica de eosina al 0'5 por 100 o la acuosa al 1 por 100.

3.° Lavado en agua y desecación.

4.° Acción de alguna de las fórmulas de hematoxilina descritas, y preferentemente la de Delafield, filtrada, de tres a cinco minutos.

5.° Lavado y desecación.

La observación puede verificarse con el objetivo de inmersión sin necesidad de cubre, pero si se quiere una conservación más perfecta o ha de ser observada con los objetivos a seco, se pondrá una gota de bálsamo al xilol perfectamente neutro y un cubre, que oprimiremos con suavidad para eliminar el bálsamo excedente.

Es una de las coloraciones preferidas para la demostración de la estructura nuclear de todas las variedades de leucocitos e insustituible para los linfocitos y núcleos de las células plasmáticas; aunque las granulaciones neutrófilas son destruídas, las eosinófilas y los hematíes aparecen bien coloreados por la eosina.

Azul de metileno-eosina. — Estas dos materias colorantes pueden ser empleadas sucesiva o simultáneamente. Los procedimientos basados en la acción sucesiva de los dos colorantes, antes muy empleados, han sido sustituídos casi por completo por los segundos que proporcionan, por regla general, imágenes más perfectas y completas; empero debemos mencionar entre aquéllos el

Método de v. Müllern. — 1.° Fijación de tres minutos en alcohol metílico.

2.° Disolución de eosina francesa pura en alcohol de 70° al 0'5 por 100, de tres a cinco minutos.

3.° Lavado en agua y desecación por papel.

4.° Coloración durante medio a un minuto con la siguiente mezcla frescamente preparada:

Disolución acuosa de azul de metileno B. pat. o rectificada Ehrlich, no del medicinal.....	XX gotas.
De la disolución alcohólica de eosina al 0'5 por 100.....	X —

La adición de eosina al azul de metileno en este tiempo tiene por objeto el evitar que la coloración de eosina anteriormente obtenida sea desalojada por el azul de metileno, permaneciendo teñidas en rojo las granulaciones neutrófilas.

5.° Rápido lavado en agua y rápida desecación con papel chupón. Bálsamo neutro.

Este método colorea muy bien los núcleos, las granulaciones eosinófilas y neutrófilas y los glóbulos rojos.

Métodos de Jenner y May-Grünwald. — Los métodos en que simultáneamente actúan el azul de metileno y la eosina, ideados con independencia por Jenner primero y por May y Grünwald después, están basados en el empleo de una débil combinación formada entre ambos colorantes, que se descompone en el mo-

mento de teñir, fijándose la eosina sobre los elementos básicos y el azul sobre los ácidos.

El colorante se prepara mezclando un litro de la disolución al 1 por 1.000 de eosina en agua destilada con otro litro de la disolución de azul de metileno medicinal al 1 por 1.000, también en agua destilada; después de algunos días de contacto se filtra ayudándose con la aspiración de la trompa, se lava el precipitado hasta que el agua pase sin teñir, se le deseca y recoge, constituyendo la materia colorante. Su disolución saturada en alcohol metílico que no contenga acetona, es lo que se emplea en las coloraciones. Las casas de Grübler y Burrough, Welcome, proporcionan el polvo y el reactivo perfectamente preparados.

La coloración, si se trata de extensiones recientes, que son las preferibles para estos métodos, no necesitan fijación previa, pues basta la acción del alcohol metílico que sirve de disolvente para conseguirlo; si las extensiones llevan algún tiempo hechas, convendrá fijar durante diez o veinte minutos en alcohol absoluto o metílico.

El método consta de los siguientes tiempos:

1.° Acción durante dos o tres minutos del colorante puro, que actúa como fijador.

2.° Al colorante extendido sobre el porta, y lo que es mejor, por debajo de la extensión, invertida, se le añade una cantidad igual de agua destilada por medio de una pipeta, y verificando aspiraciones e insuflaciones repetidas se procura que mezclen bien ambos líquidos; de cinco a quince minutos.

3.° Rapidísimo lavado en agua común o, más largo, en agua destilada, hasta que la preparación tome una coloración rosácea. Algunos añaden a un litro de agua destinada al lavado una o dos gotas de ácido acético.

4.° Desecación y bálsamo neutro.

Si hubo necesidad de fijar previamente con alcohol, la coloración, se verificará desde luego con la dilución del colorante en dos partes de agua destilada, quedando iguales los tiempos 3.° y 4.°

Los hematíes y las granulaciones neutrófilas se presentan de color rojo claro; las granulaciones eosinófilas, intensamente rojas; los núcleos y las plaquetas, azul pálido; los núcleos de

los eritoblastos, intensamente azules; las granulaciones de las células cebadas, violetas. Los núcleos y las granulaciones neutrófilas no aparecen tan bien como en otros métodos.

Azur-azul de metileno-eosina. — El azur, materia colorante roja que se desenvuelve sobre todo en las disoluciones alcalinas de azul de metileno, por envejecimiento y más rápidamente por calentamiento, fué utilizado primeramente por Romanowsky, mezclándolo con eosina. Posteriormente, Giemsa observó que la presencia del azul de metileno en exceso dificultaba el funcionamiento del azur y lo separó de las disoluciones en que se forma, dándole el nombre de azur I y reservando el de azur II para la mezcla de azur I y azul de metileno en las proporciones debidas. Una mezcla de este azur II con eosina disuelta en glicerina y alcohol metílico forma el colorante de Giemsa, que supera a todos los demás numerosos sucedáneos del Romanowsky.

Método de Giemsa. — 1.° Fijación de las extensiones recientes en alcohol metílico durante tres minutos; las que lleven más de veinticuatro horas extendidas se fijarán solamente dos minutos o veinte en alcohol etílico absoluto.

2.° Evaporado el alcohol se tiñen de preferencia las extensiones, invertidas, durante veinte a sesenta minutos, en el colorante, diluído del siguiente modo: a uno o varios centímetros cúbicos de agua destilada, perfectamente neutra, se añaden otras tantas gotas del líquido de Giemsa, que sobrenada y se mezcla mal; pero soplando suavemente en la superficie del agua con la misma pipeta que nos ha servido para depositar las gotas, armada de una perita de goma, se consigue que la mezcla se haga con lentitud, pero perfecta, y que no se estropee el reactivo.

3.° Lavado con un chorro de agua corriente, desecación, bálsamo.

Otro procedimiento, muy utilizado actualmente, consiste en colocar las extensiones en portas, invertidas, en placas de Petri, apoyándolas sobre otros portas de modo que la sangre no toque el fondo. Entre los dos cristales, valiéndose de una pipeta, se colocan de 10 a 15 gotas del líquido de Giemsa, diluído en una cantidad igual de alcohol metílico, y, después de medio a un minuto, se añaden tantos centímetros cúbicos de

agua destilada neutra como gotas se pusieron del colorante. Se prolonga la coloración, una vez diluída con el agua, de tres a cinco minutos, y después se lava, se deseca y se monta con bálsamo neutro.

El agua destilada que se emplee para la dilución del líquido de Giemsa debe estar completamente libre de ácidos y, para comprobarla, se ponen en un tubo de ensayo, muy limpio, 10 centímetros cúbicos del agua a ensayar, se añaden dos o tres gotas de una disolución alcohólica de hematoxilina (alcohol al 96 por 100), recientemente preparada, debiendo el agua permanecer incolora o tomar, a lo más, un ligero matiz amarillento en cinco minutos; se repite después la prueba, añadiendo además gotas de una disolución al 1 por 100 de carbonato potásico o sódico, hasta que, en más de un minuto y menos de cinco, tome una clara coloracion violeta, y esta alcalinidad será la preferible para el agua destilada.

Con el método de Giemsa los hematíes se tiñen de color rosa, con tendencia al azul, en lcs casos de policromasia; los núcleos, en las extensiones finas, se muestran rojos; en las partes espesas tienden al azul; las granulaciones eosinófilas aparecen de color rojo-claro; las neutrófilas, rojo violetas; las de las células cebadas, de violeta-malva; las basiófilas inmaturas, azules, y los parásitos de la sangre, sobre todo los espirochetes, tripanosomas y el *plasmodium malariæ*, se dibujan con gran perfección.

Método de Leishmann. — También consiste en la mezcla de azur, azul de metileno y eosina, pero disueltos en alcohol metílico, como en los métodos de Jenner y May-Grünwald; de modo que, al igual que en éstos, se prescinde por completo de la fijación.

1.° Fijación con el colorante extendido sobre el porta, y mejor todavía, introducido por debajo del porta, invertido, durante un minuto.

2.° Se diluye el colorante añadiendo una cantidad igual de agua destilada a la que se puso de aquél, y con la misma pipeta que nos sirve para añadirlo se aspira y vierte de nuevo hasta que la mezcla sea perfecta, y se continúa la coloración durante cinco minutos.

3.° Lavado, desecación y bálsamo.

Método panóptico de Pappenheim. — Con objeto de corregir la deficiente coloración de los núcleos y granulaciones neutrófilas del método de May-Grünwald, la escasa diferenciación entre las granulaciones neutrófilas y las azurófilas y la tinta poco definida de los hematíes en el método de Giemsa, Pappenheim ideó combinar dichos métodos del siguiente modo:

1.° Fijación-coloración en la tinta de May-Grünwald, tres minutos.

2.° Dilución del colorante con una cantidad igual de agua destilada, de tres a cuatro minutos.

3.° Se vierte el líquido anterior y, sin lavar, se añade el Giemsa, diluído en agua destilada a gota por centímetro cúbico, de cuatro a cinco minutos.

4.° Lavado, desecación, bálsamo.

Método triácido de Ehrlich. — Básase en el empleo del verde de metilo, al que se han saturado sus tres grupos básicos con el Orange G y la fuchina ácida, manteniéndose disuelto el color neutro resultante por un exceso de fuchina ácida. Se puede preparar mezclando

Disolución acuosa concentrada de Orange G	120	cent. cúb.
Disolución acuosa concentrada de fuchina ácida	80	—
Disolución acuosa concentrada de verde de metilo	100	—
Agua destilada	300	—
Alcohol absoluto	180	—
Glicerina	50	—

La mezcla es utilizable en cuanto se hace. Debe preferirse la mezcla preparada ya por la casa Grübler.

La coloración se verifica del siguiente modo:

1.° Fijación por el calor a 120° durante varios minutos, a 140° medio minuto.

2.° Coloración en el líquido de Ehrlich durante cinco minutos, tomando el color del frasco mediante pipeta para impedir que se revuelvan los precipitados, pues debe evitarse la filtración.

3.° Lavado abundante hasta que no suelte más color, desecación y bálsamo.

Es el método mejor para el teñido de las granulaciones neutrófilas, que aparecen rojo-violadas; las eosinófilas, rojo-cobrizo; los hematíes, anaranjados; los protoplasmas y granulaciones basiófilos quedan incoloros y los núcleos se impregnan muy deficientemente de color verde-azulado. Para corregir esta deficiente coloración de los núcleos, se puede dar una segunda coloración con azul de metileno.

Método de Unna-Pappenheim al verde de metilo y pironina. — Para la coloración de las extensiones de sangre con este método:

1.° Se fija con alcohol metílico o calor.

2.° Se tiñe de cinco a diez minutos con el líquido preparado por Grübler.

3.° Se lava abundantemente, desecación y bálsamo.

Es muy apropiado para la demostración del protoplasma de los linfocitos, que aparece intensamente rojo, así como el de las células plasmáticas e irritativas y los hematíes con policromasia. Los núcleos resultan violetas, excepto los de los linfocitos, que son azul-verdosos. Los nucleolos resaltan en rojo sobre los núcleos azulados.

B) Coloraciones especiales.

Método de Ehrlich para las granulaciones basiófilas. — 1.° Fijación por el calor o con alcohol metílico.

2.° Coloración de cuatro a seis horas en la solución concentrada de dalia de la casa Grübler o preparada con

Alcohol absoluto.....	50	cent. cúb.
Agua destilada.....	100	—
Ácido acético.....	12'5	—

Satúrese con Dalia.

3.° Lavado rápido en agua, decoloración en alcohol hasta que no suelte más color, desecación y bálsamo.

Las granulaciones basiófilas resultan violetas.

Método de Türk para las granulaciones de las células cebadas. —

1.° Fijación por el calor o alcohol metílico.

2.° Coloración con una disolución de azul de metileno al 10 por 100 con el 50 por 100 de alcohol, calentando suavemente hasta la producción de vapores.

3.° Se deja enfriar y se lava rápidamente en agua.

4.° Líquido de Lugol (yodo, 1; yoduro potásico, 2; agua, 300), medio minuto.

5.° Rápido lavado en agua.

6.° Inclusión en la siguiente goma yodada: yodo, 1; yoduro potásico, 3; agua, 100; goma arábiga, cantidad suficiente hasta que el líquido tenga consistencia de jarabe.

Las granulaciones de las células cebadas son intensamente negras, las eosinófilas y neutrófilas sólo se colorean accidentalmente de amarillo.

Método de Altmann-Schridde. — 1.° Fijación en formol Müller, dos horas.

2.° Lavado de algunos minutos en agua destilada.

3.° Inmersión de media hora en ácido ósmico al 1 por 100 en la obscuridad.

4.° Lavado rápido en agua.

5.° Coloración con la disolución de fuchina ácida en agua de anilina de Altmann (disolución saturada en frío de aceite de anilina, filtrada por filtro mojado, 100 cent. cúb.; fuchina ácida, 20 gramos; fíltrese), calentando cinco o seis veces hasta la formación de vapores.

6.° Se vierte el color excedente y se seca con el papel chupón.

7.° Diferenciación con el alcohol pícrico (disolución alcohólica saturada de ácido pícrico en alcohol de 96 por 100, una parte; alcohol al 20 por 100, siete partes), cambiándolo mientras se tiña de rojo, hasta que la preparación aparezca amarillenta.

8.° Lavado en alcohol de 96 por 100, en absoluto, xilol y bálsamo.

Las granulaciones eosinófilas se tiñen de rojo obscuro; las neutrófilas de rojo pardo pálido, quedando sin teñir las basiófilas, como si fueran vacuolas. Los linfocitos muestran granos o bastoncitos de color amarillento rojizo en torno del núcleo.

Método de Ehrlich para la demostración del glucógeno. — Se colocan las preparaciones algunos minutos en una cámara bien cerrada en cuyo fondo se han puesto algunos cristales de yodo,

para que los vapores tiñan el glucógeno. La observación se verifica en jarabe de levulosa.

Método de Schultze para la demostración de las oxidasas.—1.° Fijación en formol al 4 por 100 o en vapores de formol.

2.° Acción durante algunos minutos de una disolución al 1 por 100 de α-naftol en agua, hecha en caliente, añadiendo la cantidad precisa de lejía de potasa para que todo el naftol se disuelva.

3.° Disolución acuosa de dimetilparafenilenodiamina hecha a la temperatura de la habitación, también durante algunos minutos.

4.° Observación en agua o en glicerina.

Los leucocitos de la serie mielógena que contienen oxidasas se tornan azules por la formación del indofenol.

También se puede hacer la coloración mezclando a partes iguales las dos disoluciones y haciéndolas actuar simultáneamente.

IV. — Determinación de la proporción de las distintas variedades de leucocitos

Tiene lugar de preferencia en las preparaciones coloreadas de sangre, y por eso la hemos dejado para este lugar, separándola de la numeración absoluta.

Consiste en recorrer detenidamente preparaciones bien extendidas y coloreadas, observando atentamente los leucocitos, al mismo tiempo que se los va contando y distribuyendo por variedades, de la siguiente manera: En una hoja de papel blanco se encabezan varias líneas con los nombres de las distintas variedades de leucocitos:

Mielocitos neutrófilos.....
— eosinófilos.....
— basiófilos.....
Neutrófilos.....
Eosinófilos.....
Linfocitos.....
— grandes.....
Mononucleares grandes.....
Formas de transición.....
— irritativas.....
Células cebadas.....
— plasmáticas.....

Se examina un crecido número de leucocitos, por lo menos 300, anotando la variedad de cada uno por medio de una rayita en la serie correspondiente; en lo que a los neutrófilos se refiere, por ser mucho más abundantes que los demás, se pueden anotar rayas que correspondan a grupos de 10; en los demás, cada raya corresponde a un leucocito y se agrupan formando cuadraditos para que la cuenta sea más sencilla.

También se pueden destinar otras series a la cuenta de los normoblastos y megaloblastos, examinando al mismo tiempo los hematíes.

Para que la cuenta sea lo más exacta posible, es necesario que no contemos varias veces los mismos leucocitos, y para ello conviene ayudarse de una platina móvil. Si la sangre contuviera un número excesivo de leucocitos, como ocurre en las leucemias muy intensas, será forzoso apelar al ocular de Ehrlich para circunscribir un campo limitado.

Por último, si queremos hallar la fórmula de Arneth será preciso subdividir la serie de los neutrófilos en otras cinco, según que tengan de uno a cinco núcleos o asas, entendiendo por los primeros las masas de núcleo globulares o poliédricas unidas por puentes finos o aislados, y considerando como asas las gruesas porciones alargadas y retorcidas de distintos modos, con las subdivisiones que en los trabajos de dicho investigador se mencionan.

Después de contados de 300 a 500 leucocitos, se halla el tanto por ciento correspondiente a cada una de las variedades, y de este modo se obtiene la fórmula leucocitaria.

V. — Demostración de los parásitos de la sangre

De la investigación de los numerosos microbios que pueden encontrarse en la sangre, nos ocuparemos en la sección correspondiente de la parte bacteriológica, limitándonos en este momento a decir algo de los parásitos animales que se ponen de manifiesto con recursos técnicos análogos a los que acabamos de describir para el estudio de los elementos formes de la sangre.

El examen en fresco mediante una gota de sangre colocada

entre porta y cubre, permitirá en muchas ocasiones el hallazgo de ciertos parásitos que se señalan por la presencia de pigmentos (hemozoína en la malaria) o por sus movimientos (tripanosomas, filarias).

Para un examen rápido en extensiones nos prestará grandes servicios el *azul de Manson.*

Agua hirviendo	100 cent. cúb.
Bórax.....	5 gramos.
Azul de metileno med. pur. Höchst..	2 —

diluído hasta que deje pasar la luz a su través. Las extensiones fijadas se tiñen de diez a quince segundos, hasta que tomen color verde.

Los métodos preferibles para el examen de las extensiones son el Jenner-May Grünwald, las modificaciones del Romanowsky, en especial el Giemsa y el panóptico de Pappenheim.

Si, como ocurre con frecuencia en la sangre, el número de parásitos no es muy grande, será forzoso el examen de varias preparaciones con todo detenimiento para dar con ellos o apelar al *procedimiento de Stäubli,* que permite el examen de una gran cantidad de sangre. Consiste en tomar con la pipeta del hematímetro, destinada a los leucocitos, una gota de sangre y diluirla en 10 veces su volumen de ácido acético al 3 por 100; de este modo se disuelven los hematíes, que por su gran número son los que verdaderamente dificultan en el examen de una gran cantidad de sangre. A continuación se vierte el contenido de la pipeta en tubos finos de centrífuga, y después de la centrifugación se hacen extensiones con el sedimento.

CAPÍTULO IX

I. — Órganos hematopoiéticos

La especial estructura de estos órganos, constituídos por células formadoras de los distintos elementos de la sangre, sostenidos por escaso tejido conectivo, presta a su técnica condiciones especiales que debemos mencionar.

Obtención del material. — Hemos insistido repetidamente sobre

la conveniencia de que al tallar los trocitos de los órganos que hemos de utilizar en el examen histológico, se proceda con la mayor precaución, utilizando instrumentos que corten perfectamente, pues de lo contrario, las células resultan comprimidas, magulladas y en muchas ocasiones dislocadas, es decir, empujadas fuera de su sitio ordinario, por las presiones provocadas en el momento de la sección. Esta regla alcanza una importancia extraordinaria en los órganos hematopoiéticos, por la mencionada flojedad del conectivo que sujeta sus elementos; emplearemos instrumentos perfectamente vaciados que corten con una gran facilidad, y no sujetaremos los órganos con los dedos, limitándonos a soportarlos mientras los instrumentos seccionan.

La alterabilidad de estos elementos aconseja su rápida fijación, debiendo utilizarse a ser posible material muy fresco, de cadáver caliente y mejor todavía recién extirpado por intervención quirúrgica, médula ósea en fracturas o amputaciones, ganglios extirpados, bazos accesorios separados en algunas laparotomías, etc.

Ya hemos dicho en el curso de la autopsia, que la médula ósea era examinada serrando en toda su longitud el fémur, y claro es, que de ella tomaremos la que creamos necesaria para las investigaciones histológicas. Para obtener la médula necesaria con este objeto, no es preciso serrar todo el hueso, basta que practiquemos a lo largo de la diáfisis, con la sierra, dos cortes que comprendan algo más de la mitad del hueso, transversalmente se unen dichos cortes por otros perpendiculares, y después se hace saltar el fragmento con el escoplo, procurando que salga de dentro a fuera, y no llegue a comprimir en ningún momento la médula ósea. Valiéndonos de espátulas y siempre evitando cuidadosamente las compresiones, extraeremos el cilindro medular.

Observación en fresco. — Como en la sangre, tiene mucha más importancia que en los demás órganos, porque la facilidad con que se desprenden las células consiente obtener sencillamente disociaciones que orientan sobre las alteraciones que en su estructura muestre el órgano. Cuando el órgano tiene una consistencia algo mayor, como ocurre con el bazo y los ganglios, según hemos indicado en la parte general, basta raspar la su-

perficie con el cuchillo y extender la pequeña cantidad de material obtenido en solución salina normal.

La observación en fresco permite mucho mejor que la observación en los cortes el estudio de muchas células, y en especial las formadoras de los hematíes. Haciendo penetrar entre porta y cubre una gota de una disolución diluída de azul de metileno, rojo neutro u otro colorante, gracias a la ligera coloración que toman los núcleos, resultan más fácilmente diferenciables los distintos tipos celulares.

Extensiones coloreadas.—Se preparan frotando la superficie del porta o del cubre según los casos, con un trocito del órgano, de modo que se forme una capa finísima y lo más uniforme que sea posible, procediendo en la fijación, coloración y montaje como en las preparaciones de sangre.

Estudio en los cortes. – Como todos los demás órganos, después de fijar trocitos de los órganos hematopoiéticos en formol, o en el fijador más apropiado para el método colorante que hayamos de utilizar, podremos verificar todas las operaciones necesarias para incluirlos y cortarlos, pudiendo estudiar las células en los cortes teñidos. El procedimiento de inclusión es indiferente, aunque algunos aconsejan la inclusión en parafina para que los cortes sean finísimos.

Cuando sea preciso decalcificar apelaremos, según el consejo de Schridde, a la siguiente mezcla de formol y ácido nítrico: formol, 10; ácido nítrico oficinal, 20; agua destilada, 90.

En el teñido pueden emplearse todos los métodos generales descritos, especialmente la hematoxilina-eosina, el van Gieson, los de la grasa, glucógeno y fibrina, los del conectivo y de las granulaciones, debiendo indicar solamente en este lugar el modo de aplicar a los cortes los procedimientos de Giemsa y May-Grünwald.

Método de Giemsa para los cortes.—1.° Fijación en una mezcla de dos partes de disolución acuosa concentrada de sublimado y una de alcohol absoluto, o en la disolución acuosa concentrada de sublimado solamente durante dos días.

2.° Deshidratación, inclusión en parafina, cortes, desparafinación, hidratación progresiva de los cortes hasta llegar al agua.

3.° Diez minutos en

Agua.....	100 cent. cúb.
Yoduro potásico.....	2 gramos.
Disolución de Lugol.....	3 cent. cúb.

4.° Lavado rápido en agua destilada.

5.° Diez minutos en disolución acuosa de thiosulfato sódico al 0'5 por 100.

6.° Lavado en agua corriente durante cinco minutos, seguido de otro rápido en agua destilada.

7.° Coloración en el líquido de Giemsa diluído, a gota por centímetro cúbico de agua destilada completamente libre de ácidos, de dos a doce horas o más, cambiando el líquido después de media hora.

8.° Lavado rápido en agua destilada.

9.° Diferenciación y deshidratación en

a) Acetona 95 cent. cúb. y xilol 5 cent. cúb.

b) — 70 — — 30 —

c) — 70 — — 50 —

d) Xilol puro.

e) Aceite de cedro.

El estudio se hace en aceite de cedro. Las coloraciones son idénticas a las obtenidas en las extensiones.

La *modificación de Schridde* consiste en

1.° Llevar los cortes ya en agua al colorante de Giemsa diluído de modo que cada centímetro cúbico del agua destilada haya dos gotas del color, procurando que al efectuar la mezcla no se formen precipitados, pues si se forman debe ser desechada la mezcla. El colorante diluído debe aparecer al comienzo de la coloración uniformemente azul. La coloración durará veinte minutos.

2.° Lavado rápido en agua destilada y desecación con papel chupón.

3.° Acetona purísima libre de ácidos, de medio a un minuto.

4.° Toluol libre de ácidos o xilol y bálsamo.

Modificación de Zieler al método de May-Grünwald para los cortes.

1.° Fijación en líquido de Orth o de Zenker, inclusión en parafina, cortes, desparafinación, hidratación progresiva hasta el agua destilada.

2.° Coloración de dos a tres minutos en el líquido de May-

Grünwald, extraído sin agitar y sin filtrar por medio de una pipeta.

3.° Abundante lavado en agua destilada. Desecación con papel chupón. Los cortes muestran un color rojizo.

4.° Acetona purísima libre de ácidos, en la que pierden los cortes algo de color azul, aclaramiento en xilol o toluol libres de ácidos y bálsamo.

II. — Examen citológico de los exudados

La investigación citológica de los exudados está íntimamente ligada por sus procedimientos con la técnica hematológica, fuera de los distintos modos de procurarse el material, y como por otra parte su técnica especial los aproxima cualquiera que sea su procedencia entre sí mucho más que con los órganos de que proceden, creemos preferible el agruparlos en su descripción.

Como es sabido, la mayor parte de las cavidades serosas son más bien virtuales, y sólo en condiciones patológicas contienen un exudado que pueda ser recogido y analizado. Desde los estudios de Widal y Rabaut, la investigación citológica de los exudados ha adquirido cada vez mayor importancia y alguna, como la del líquido cefalorraquídeo, se verifica corrientemente con fines a la par diagnósticos y terapéuticos en las enfermedades del sistema nervioso y en las infecciones.

Los exudados con más frecuencia examinados son: los cefalorraquídeos, pleuríticos, pericardíacos, peritoneales, articulares, el contenido de quistes y otras colecciones líquidas.

Recolección del líquido que se va a examinar. — En un gran número de casos el anatomopatólogo recibe el líquido extraído por el clínico, pero, con frecuencia también, aquél debe practicar la extracción de los exudados de los mismos enfermos, y constantemente en las autopsias, por lo que resulta conveniente el recuerdo de los procedimientos más prácticos.

Ante todo debemos indicar que todas las manipulaciones en la extracción de exudados deben ser regidas por la asepsia más rigurosa, trátese de enfermos o cadáveres, pues aunque la investigación no haya de ser de carácter bacteriológico, la impurificación lleva aparejada la inutilización del líquido obte-

nido, favorable terreno para la germinación de casi todos los microbios, que con sus fermentaciones todo lo modifican. En los enfermos la asepsia evita la impurificación de las cavidades y nuevos riesgos. Según esto, todos los instrumentos que utilicemos estarán cuidadosamente desinfectados por ebullición, pero no llevarán substancias antisépticas, y con el mismo cuidado desinfectaremos en cuanto sea posible el campo operatorio y las manos con lavados jabonosos enérgicos, seguidos de lociones alcohólicas después del aclaramiento.

La *extracción del líquido cefalorraquídeo* tiene lugar por medio de la punción lumbar. Esta se practica colocando el enfermo o el cadáver en el borde de la cama o de la mesa en decúbito lateral con las piernas encogidas sobre el vientre en forma de gatillo y el dorso encorvado para que se hagan bien prominentes las apófisis espinosas de las vértebras. Al mismo tiempo que con una mano se marca la altura de la cresta ilíaca, con la otra se busca el espacio interespinoso colocado al mismo nivel, que será el cuarto espacio lumbar, al cual como sabemos sólo llegan las raíces de la cola de caballo y el *filum terminale,* pero no la médula, evitándose de este modo las consecuencias desagradables que seguirían a la herida de la médula.

Una vez marcado el cuarto espacio interespinoso y lavada la región, se introduce resueltamente en la línea media de dicho espacio una aguja de jeringa de unos 7 centímetros, y mejor un trócar de las mismas dimensiones, de bisel corto, de atrás a adelante, de abajo a arriba, de modo que llegue al saco dural por entre ambas apófisis espinosas; si el instrumento no está bien dirigido y tropieza en hueso, se le hace retroceder sin sacarlo del todo, y corrigiendo la dirección se vuelve a introducir. Si a pesar de haber llegado al saco dural, lo que se conoce en la casi total penetración, no sale líquido, sobre todo si se emplean cánulas de jeringa, puede ser debido a su obstrucción y en este caso introduciendo un fino alambrito se consigue desobstruirla, pero si a pesar de varias tentativas sigue sin salir el líquido, sáquese el instrumento y verifíquese de nuevo la punción.

Según la tensión del líquido sale babeando, en gotas o a chorro, se extraen de 5 a 10 cent. cúb., a menos que indicaciones terapéuticas aconsejen la extracción de mayor cantidad, que se

recogen en tubos de centrífuga esterilizados, y si las primeras gotas salieran muy mezcladas con sangre, convendría separar las gotas que salgan posteriormente, para que la sangre no estorbe en la investigación microscópica.

Los *exudados pleuríticos* se extraen por medio de la toracentesis. Si se trata de un derrame pleurítico abundante y típico se podrá verificar la punción en el quinto o sexto espacio intercostal al nivel de la línea axilar anterior, o más abajo, hacia el octavo en la línea escapular, pero es conveniente ayudarse siempre de los procedimientos exploratorios corrientes, palpación, percusión y auscultación para marcar el sitio más favorable para la extracción del líquido, y sobre todo si se trata de derrames enquistados. Marcado y limpio el espacio intercostal preferible, penetraremos con la aguja por el centro del espacio para evitar los vasos que caminan por la parte superior, 2 o 3 centímetros, rectificando cuantas veces sea necesario la posición de la aguja hasta que el líquido salga.

Los *exudados abdominales* serán extraídos por punción por medio de trócar o aguja de jeringa en el sitio de elección para la paracentesis o sea en el punto medio de la línea que une la espina ilíaca anterior superior con el ombligo, si la cantidad de líquido es grande y la colección está libre; en otro caso nos guiaremos siempre por una exploración cuidadosa en la determinación del lugar preferible.

Una exploración detenida nos guiará igualmente en la punción de quistes, derrames articulares y otras acumulaciones de líquidos que hayamos de examinar.

Examen del líquido extraído. —El aspecto de los exudados es muy distinto, según el número de elementos celulares que contienen; si éstos son escasos, el líquido será transparente como agua de roca, y en cambio se tornará tanto más turbio cuanto mayor número de células contenga. En relación con este distinto contenido celular, el examen citológico podrá ser hecho directamente con líquidos turbios, pero en los líquidos transparentes habremos de apelar a la decantación y mejor a la centrifugación si queremos reunir un número de células que nos consienta formar un juicio exacto. La decantación la practicaremos recogiendo los líquidos en tubos de centrífuga y dejándolos en reposo unas cuantas horas para que las células

se reunan en la parte cónica del tubo; este procedimiento lento y poco seguro es sustituído con ventaja por la centrifugación, necesaria de todo punto cuando el número de células sea escasísimo en extremo. La centrifugación se debe verificar a gran velocidad, y una vez recogidos los elementos formes en el fondo del tubo, se vierte el líquido invirtiendo el tubo rápidamente; a continuación, con una asa de platino como las que se emplean en bacteriología, se extrae el sedimento con la pequeña cantidad de líquido que resta y se practica el examen acto seguido.

El sedimento puede ser examinado en fresco y en extensiones fijadas y teñidas, y tanto en un caso como en el otro procederemos según hemos dicho para la sangre. De idénticos métodos nos valdremos también para la determinación de la proporcionalidad de los distintos elementos en las extensiones coloreadas.

Si la cantidad de elementos celulares es muy escasa, sobre todo tratándose del líquido cefalorraquídeo en que la cantidad extraída es siempre relativamente pequeña en comparación con la que se puede extraer de las demás cavidades, se puede apelar para su examen al procedimiento de Alzheimer.

Método de Alzheimer. — Consiste en la coagulación de la albúmina contenida en el líquido por medio del alcohol, a fin de que en dicho coágulo queden englobadas todas las células y puedan ser después tratadas como una porción de un tejido.

1.° Al líquido, colocado en un tubo de centrífuga cilindrocónico, se le añade gota a gota doble cantidad de alcohol de 96 grados.

2.° Se centrifuga por espacio de una hora, con lo cual la albúmina se coagula y se recoge en el fondo cónico.

3.° Se vierte el líquido dejando el coágulo en el tubo.

4.° Se añade sucesivamente al coágulo alcohol absoluto y alcohol-éter, permaneciendo en contacto con cada uno de ellos una hora.

5.° Por medio de una aguja de platino se desprende el coágulo de la pared y se le deja caer con cuidado en un tubo con celoidina, donde permanece de doce a veinticuatro horas.

6.° Se monta sobre corcho como otro objeto cualquiera y se corta, tiñendo los cortes por el método de Pappenheim al ver-

de de metilo y pironina, por el Giemsa o Leishmann, por el Janner o May-Grünwald, o cualquier otro de los métodos descritos.

CAPÍTULO X

I.—Aparato circulatorio

Carece de una técnica especial, siéndole aplicables los procedimientos generales más apropiados para poner de manifiesto las lesiones más comunes en sus distintos órganos.

En disociaciones de las fibras musculares del corazón se podrá diferenciar la degeneración grasienta y turbia, y siempre serán de gran utilidad en el estudio de todos los órganos del sistema vascular, los teñidos de la grasa, de la cal, del conectivo y de las fibras elásticas.

II.—Aparato respiratorio

Encuentran aplicación igualmente todos los métodos generales, debiendo mencionar en especial la gran importancia que en el juicio de los exudados contenidos en los alvéolos pulmonares tiene el teñido de la fibrina y la cocción para la demostración del edema pulmonar.

Esputos.—Consecuentes con el método adoptado, reservaremos para la parte bacteriológica el estudio de las investigaciones de esta naturaleza que puedan ser practicadas con los esputos, y prescindiremos de las de carácter químico que no tienen cabida en esta obra, limitándonos al examen histopatológico.

Los esputos deben ser examinados lo más pronto que sea posible después de ser expulsados, pues aunque el peligro de la impurificación no sea en el examen histológico tan importante como en el bacteriológico, es indudable que las fermentaciones que en ellos pueden desarrollarse modificarán notablemente la morfología, la estructura y las apetencias tintóreas de sus elementos, dificultando cada vez más la obtención de buenas preparaciones.

Para recoger el material apropiado, colocaremos los esputos

en una placa de cristal de Petri, o en un cristalizador, porque de esta manera superponiendo la vasija de cristal alternativamente sobre fondo blanco y negro, podremos darnos clara cuenta del distinto aspecto de las diferentes partes del esputo, eligiendo en cada caso la que juzguemos más apropiada. La parte escogida es transportada por medio de agujas a otra placa de Petri con solución salina, donde se la lava con el mayor esmero, renovando varias veces el líquido hasta que hayamos descartado todas las partes adheridas a su superficie durante el tránsito por la faringe y boca.

Una vez lavada la partícula de esputo, si ha de ser observada en fresco se coloca sencillamente entre porta y cubre y se examina al microscopio, procurando diafragmar como diremos en la parte bacteriológica al ocuparnos del estudio de los microbios en fresco mediante la gota pendiente. El examen en fresco nos permitirá un estudio bastante completo de la morfología y estructura de las células epiteliales, glóbulos del pus, elementos de la sangre, de las fibras elásticas, del aspecto de la mucina, de la existencia de los cristales de Charcot-Leyden, etcétera. A un observador experimentado, el estudio en fresco de los esputos le permite formar un juicio bastante completo sobre la composición histológica.

Las preparaciones teñidas se verifican en extensiones finas sobre porta o cubre por medio de las agujas de disociar, pues las extensiones obtenidas por compresión entre dos cristales, además de resultar bastante sucias, forman siempre capas demasiado gruesas. La fijación y teñido de las extensiones se verifica por los métodos descritos al hablar de la sangre, debiendo añadirse el método de Weigert para las fibras elásticas, que aparecen en los esputos procedentes de lesiones destructivas.

Para la demostración de las fibras elásticas, podemos ayudarnos de reactivos químicos que destruyen la mucina y facilitan la captura de las fibras elásticas por medio de la centrifugación o la decantación. Todos los medios de homogeneización, que describiremos al ocuparnos de la técnica especial del bacilo tuberculoso, son aplicables, pero se prefieren generalmente para la indagación de las fibras elásticas la acción de la lejía de potasa al 1 por 100, o el cocimiento del esputo con una cantidad igual de lejía de potasa al 10 por 100 y cinco partes

de agua destilada. Una vez homogeneizados los esputos, son colocados en una copa cónica de recoger sedimentos, y después de algún tiempo, se examina el sedimento recogido mediante una pipeta, en frasco o en extensiones coloreadas por el procedimiento de Weigert. Si se dispone de una centrífuga, la sedimentación se obtiene con mucha mayor rapidez. Para facilitar la adherencia al porta-objeto, muy dificultada por el tratamiento alcalino, será conveniente mezclar el sedimento con una pequeña cantidad de saliva del operador o de un líquido albuminoso.

Cuando se requiera un examen histológico todavía más completo, se pueden fijar, indurar, incluir y cortar porciones del esputo, que se teñirán por los procedimientos convenientes. De cualquier manera no consideraremos terminado el estudio de un esputo sin haber examinado sus diferentes porciones y haber formado un juicio completo sobre su constitución histológica.

III. — Aparato digestivo

Pocas observaciones técnicas hemos de hacer respecto a los órganos del aparato digestivo en especial, pero conviene recordar que si la autolisis subsiguiente a la muerte puede alterar notablemente las estructuras de todos los órganos, este inconveniente adquiere notoria importancia en los órganos digestivos que en vida fabrican fermentos digestivos de gran potencia y que continúan segregando algún tiempo después de la muerte. Si a esto se añade que los revestimientos epiteliales del estómago e intestino se ponen en íntimo contacto con varios de estos líquidos formados *post-mortem* y con los que segregados, quedan retenidos en dichas cavidades después de la muerte, se comprende la imperiosa necesidad en que nos encontramos en el estudio histopatológico de estos órganos de proceder con la mayor premura a su fijación, si no queremos encontrar corroídos los epitelios. En esta acción destructiva, ayudan activamente la gran cantidad de bacterias existentes en el contenido de dichos órganos, que aumentan con gran rapidez después de la muerte.

Por todas estas razones debemos procurar recoger el mate-

rial destinado a la investigación inmediatamente después de la muerte, y algunos, teniendo en cuenta la obligación impuesta en muchos casos de esperar algunas horas para verificar la autopsia, recomiendan practicar un avance de la fijación lavando dichas cavidades con agua o solución salina y rellenándolas después con una disolución de formol.

Las mucosas de estómago e intestinos se cortan mal con el microtomo de congelación, debiendo apelarse a la inclusión. Las coloraciones preferibles son el van Gieson para el estudio del conectivo y la hematoxilina ferruginosa con eosina para las granulaciones glandulares y demás inclusiones celulares que pueden ser puestas de manifiesto también con el Biondi-Heidenhain, el azul polícromo y el método de Altmann y sus modificaciones.

En la demostración de las degeneraciones, infiltraciones y demás lesiones fundamentales, apelaremos a los métodos descritos en la parte general.

Hígado. — Además de los métodos generales para el teñido de los protoplasmas y granulaciones intraprotoplásmicas que acabamos de indicar, los más apropiados para el estudio de los órganos glandulares, utilizaremos los que ponen de manifiesto el conectivo, pero así como en aquellos casos en que la hipertrofia del conectivo hepático es notable el método de van Gieson y los análogos prestan indudables servicios, en los primeros momentos de la alteración, solamente apelando a los procedimientos destinados al teñido de los haces colágenos finos y a la reticulina obtendremos algún resultado en las indagaciones.

Método de Kupffer, para las células de su nombre. —1.° Cortes obtenidos mediante el microtomo de congelación son introducidos durante diez minutos en una disolución acuosa de ácido crómico al 0'05 por 100.

2.° Inmersion de doce a cuarenta y ocho horas en la obscuridad en: cloruro de oro, una parte; ácido clorhídrico o formol al 0'4 por 100, una parte; agua, 1.000 partes, hasta que los cortes aparezcan rojos o violetas.

3.° Reducción de los cortes en ácido fórmico al 0'1 o 0'2 por 100.

4.° Deshidratación, xilol y bálsamo.

Las células estrelladas se muestran negras al mismo tiempo que las hepáticas aparecen rojo-violetas.

También se tiñen por el método de Bielschowsky.

Los capilares biliares se ponen de manifiesto con el método de Weigert para la neuroglia, que será descrito en la técnica especial del sistema nervioso, limitándonos a exponer aquí el de Eppinger, combinación de los métodos de Weigert para la neuroglia y la mielina.

Método de Eppinger, para la demostración de los capilares biliares. — 1.° Fijación de piezas pequeñas en formol durante cinco a diez días, dejando transcurrir algún tiempo entre la muerte y la fijación, a fin de que la excesiva turbidez del protoplasma no dificulte la aparición de los capilares.

2.° Mordiente al cobre de Weigert.

Fluoruro de cromo.....	2'5 gramos.
Agua.....	100 —

Se disuelve por cocción y, separando el mechero, se añade:

Ácido acético ordinario.....	5 cent. cúb.
Acetato neutro de cobre finamente pulverizado.....	5 gramos.
Formol.....	10 cent. cúb.

En este mordiente permanecen los cortes diez días en frío y cinco en estufa.

3.° Inducración en alcohol, inclusión en celoidina y cortes.

4.° Coloración en una disolución acuosa en caliente de hematoxilina al 1 por 100, de media a varias horas, hasta veinticuatro, en las disoluciones recientemente preparadas.

5.° Paso directo a una disolución acuosa saturada de acetato de cobre, durante cinco minutos.

6.° Lavado de varias horas a un día en agua destilada.

7.° Diferenciación en

Ferricianuro potásico.....	2'5 gramos.
Bórax.....	2 —
Agua.....	100 cent. cúb.

muy diluído en agua, aproximadamente diez minutos, hasta

que los cortes tomen color moreno, vigilando al microscopio.

8.° Abundante lavado en agua destilada.

9.° Disolución acuosa saturada de carbonato de litina, de tres a cinco minutos, hasta que la celoidina se decolore.

10. Abundante lavado en agua, deshidratación, esencia de orégano y bálsamo.

Los núcleos y los capilares biliares aparecen de color moreno.

Páncreas. — La impregnación de los *conductos glandulares* del páncreas, de la misma manera que los de las demás glándulas, se obtiene perfectamente con el método de Golgi y sus modificaciones, en especial las de Cajal, que serán descritas en la técnica del sistema nervioso, según acreditan las observaciones de Bohm, Oppel, Fusari y Panasci, Cajal y Claudio Sala. La materia segregada y acumulada en los más finos conductos atrae el cromato de plata, destacando en negro sobre el fondo amarillo transparente.

Método de Heidenhain para el teñido en masa. — Este autor prepara las glándulas y epitelio intestinal, indurando primeramente en alcohol y sumergiendo después las piezas en una solución de hematoxilina en agua al 0'5 o 1 por 100, que actúa durante seis u ocho horas. Acto seguido las abandona por veinticuatro horas en este líquido: agua, 100 gramos; cromato simple de potasa, 0'4. Extraídas del líquido (que se debe renovar varias veces), se lavan en mucha agua, se llevan al alcohol y se engloban, para ser seccionadas, en celoidina o parafina. Los núcleos adquieren matiz azulenco y los protoplasmas color gris.

Método de Benda para la necrosis de la grasa. — 1.° Inducación en formol al 10 por 100.

2.° Inmersión de dos a cuatro días en estufa en el mordiente al cobre y fluoruro de cromo, de Weigert, que acabamos de describir en el método de Eppinger, donde la grasa necrosada adquiere un intenso color verde negruzco. Los tiempos 1.° y 2.° se pueden verificar a la vez mezclando ambos líquidos.

Los cortes obtenidos por congelación pueden recibir la coloración de la grasa no necrosada, mediante el Sudan o el rojo escarlata, y una coloración nuclear por la hematoxilina. En este caso los núcleos son azules; la grasa normal, roja, y la necrosada, verde.

También se puede verificar el método de Benda con los cortes obtenidos mediante la congelación. Las disoluciones acuosas de hematoxilina no modifican el teñido de la grasa necrosada, pero las disolucioees alcohólicas los transforman en negro por formación de una laca que no se disuelve en la mezcla de bórax y ferricianuro.

Examen citológico del contenido estomacal e intestinal. — Cuando los materiales obtenidos sean muy pobres en materias sólidas, apelaremos a la centrifugación para hacer las extensiones que hemos de examinar; si no están escasos, bastará la sedimentación, y si son muy abundantes, nos veremos obligados a la dilución con sedimentaciones sucesivas para recoger los elementos que por su desigual peso específico no se separan a la par.

Como los de todos los demás líquidos que hasta ahora llevamos estudiados, el examen podrá hacerse simplemente en fresco, colocando una pequeña porción entre porta y cubre, o confeccionaremos extensiones que serán fijadas y teñidas por los mismos procedimientos que hemos expuesto al ocuparnos del examen citológico de los exudados y de la sangre.

Una inspección cuidadosa en fondo negro nos ayudará mucho en la captura de las porciones interesantes para el estudio, y en ocasiones tamizaremos las diluciones o las deposiciones muy líquidas.

Estos mismos métodos nos permitirán el estudio de los restos alimenticios y de los parásitos intestinales, o sus huevos y embriones.

IV. — Aparato urinario

También en el examen del riñón hemos de tener un gran cuidado en las fijaciones, pues los epitelios renales y de todos los conductos urinarios se desprenden con facilidad; y si esto no tiene gran importancia en el estudio de las nefritis y esclerosis renales, en las nefrosis nos deja imposibilitados de formar una idea siquiera aproximada del proceso. Por idéntica razón convendrá verificar los cortes con inclusión, pues en los cortes por congelación con frecuencia se desprenden los epitelios y hasta los glomérulos en masa.

Para el teñido se emplearán los métodos especiales de los protoplasmas y sus granulaciones en los epitelios, sobre todo el de Heidenhain y el de Altmann y para el conectivo, aunque con los métodos generales de doble y triple coloración, y en especial el de van Gieson, se obtienen imágenes demostrativas, no nos cansaremos de recomendar los métodos especiales de los finos haces colágenos y de la reticulina si se quieren observar las primeras alteraciones del conectivo. El método de Weigert para la fibrina nos servirá para poner de manifiesto los cilindros urinarios, que se tiñen en azul aunque no contengan fibrina.

El *examen citológicô de la orina* se practica con el sedimento obtenido por centrifugación o decantación, en fresco entre porta y cubre o en extensiones teñidas, según hemos dicho para los exudados. En el estudio de los cilindros urinarios nos ayudaremos de una disolución de yodo en yoduro potásico, por ejemplo, el líquido de Lugol muy diluído. Si se presentan trocitos de tumores o masas desprendidas, se estudiarán incluyéndolos y cortándolos.

V. — Cápsulas suprarrenales y paraganglios

Además de la aplicación de los métodos generales que sean precisos para el estudio de su estructura y alteraciones, es bien sabido que estos órganos cápsulas suprarrenales, glándulas carotídeas, etc., presentan entre sus elementos unas células particularmente afines por las sales de cromo, y que por esta razón son universalmente conocidas con el nombre de células cromafines. Para su estudio pueden emplearse distintos procedimientos, y en especial los dos siguientes:

Método de Wiesel. — 1.° Fijación del material lo más fresco posible en una mezcla de 20 cent. cúb. de disolución acuosa de bicromato potásico al 5 por 100, 40 cent. cúb. de formol al 10 por 100 y 40 cent. cúb. de agua destilada de uno a cuatro días.

2.° Disolución de bicromato potásico al 5 por 100 de uno a dos días.

3.° Abundante lavado en agua corriente, deshidratación, inclusión en parafina y cortes.

4.° Coloración de los cortes en disolución acuosa de azul

al agua o azul de toluidina al 1 por 100 durante veinte minutos.

5.° Lavado en agua cinco minutos.

6.° Coloración de fondo en disolución acuosa de safranina al 1 por 100 otros veinte minutos.

7.° Diferenciación en alcohol de 96 por 100 hasta que reaparezca de nuevo el color azul.

8.° Deshidratación, xilol y bálsamo.

Las células cromafines son verdes, los protoplasmas de las demás células azul claro y los núcleos rojos.

Método de Schmorl. — 1.° Fijación en la mezcla de Orth.

2.° Cortes en congelación o en inclusión.

3.° Coloración en líquido de Giemsa diluido en diez veces su volumen de agua destilada, veinticuatro horas.

4.° Lavado en agua destilada.

5.° Corta diferenciación en ácido acético en agua al 0'25 por 100.

6.° Deshidratación, xilol y bálsamo.

Las células cromafines son verdes, el protoplasma de las otras células rojo y los núcleos azul obscuro.

VI. — Aparato genital

Nada nuevo debemos exponer fuera de lo dicho a propósito de los anteriores aparatos y en la parte general, y solamente habremos de añadir algunas indicaciones respecto al estudio de los productos obtenidos en los raspados de matriz.

Los trocitos que de la mucosa de la matriz extrae la cucharilla deben ser investigados en gran número si queremos que no se nos escapen lesiones importantes. Frecuentemente a las neoplasias acompañan alteraciones inflamatorias de la mucosa y si están aquéllas muy localizadas, en unas de las porciones de mucosa arrancadas por la cucharrilla encontraremos aquéllas y en otras veremos solamente éstas. Además, como hemos indicado antes de ahora, la trabazón entre los distintos elementos de la mucosa es tan floja que no podemos cortarlos en congelación, siendo indispensable apelar a la inclusión en parafina o celoidina.

Por estas razones examinaremos detenidamente los productos obtenidos por el raspado de la matriz para separar los coá-

gulos de sangre y escoger todas las porciones que por su aspecto grisáceo y consistencia nos parezcan procedentes de la mucosa. Colocadas todas estas porciones en un frasquito, las someteremos a todas las operaciones necesarias para la inclusión, cuidando siempre al cambiar los líquidos que no se escapen los trocitos más pequeños, lo que se consigue fácilmente, por poca pericia que se tenga, vertiendo el líquido con inclinación progresiva del frasco a fin de que los tejidos por su mayor densidad queden en el fondo. Como todos los trozos son relativamente pequeños, los líquidos penetran con prontitud y bastará que cada uno actúe unas doce horas. Una vez que han permanecido los pedacitos en la materia de inclusión el tiempo debido se forma un bloque con varios de ellos y se repite la maniobra hasta formar los bloques necesarios para recoger todos.

Cada uno de los bloques son cortados según hemos dicho en la parte general y en cada corte tendremos reunidos los cortes de muchos de los trozos obtenidos por el raspador, pudiendo de esta manera estar a cubierto del inconveniente que apuntamos anteriormente, resultante de la desigual distribución de la lesión. En la coloración podemos utilizar cualquiera de los métodos de doble coloración que proporcionan imágenes de conjunto, y en especial la hematoxilina-eosina y el van Gieson.

CAPÍTULO XI

SISTEMA NERVIOSO

I. — Reglas generales

Ya hemos dicho, al ocuparnos de la autopsia del sistema nervioso, el modo de extraer y seccionar sus diferentes porciones y la manera de conservarlas. En este punto hemos de insistir especialmente en la conveniencia de practicar la autopsia con prontitud después de la muerte, a fin de que las estructuras se modifiquen lo menos posible; si por razones imposibles de vencer hay precisión de diferir la práctica de la autopsia, se

pueden someter los órganos nerviosos a una fijación previa, inyectando líquidos fijadores y en especial el formol al 10 por 100 por el saco dural, siguiendo la técnica de la punción lumbar descrita, o por el agujero mayor, o por los vasos. Debemos advertir, sin embargo, que, salvo las estructuras más delicadas, el aparato reticular de Golgi, la neuroglia protoplásmica, por ejemplo, la mayor parte de los elementos del sistema nervioso se prestan a excelentes coloraciones, aunque sean extraídos después de las veinticuatro horas de la muerte; así que las anteriores manifestaciones no deben detenernos en la investigación; aunque en los casos en que el momento de verificar la autopsia dependa de nuestra voluntad, procuraremos practicarla lo más pronto que nos sea posible.

Al hablar de cada uno de los métodos utilizados en la coloración del sistema nervioso indicaremos los fijadores más apropiados para cada uno de ellos; de modo que, cuando llevemos de antemano trazado el programa de nuestra investigación, sabremos también los fijadores que debemos utilizar; mas en aquellos casos en que por desconocer de antemano las lesiones probables, o por otras razones no tengamos determinado lo que hayamos de hacer, será conducta prudente recoger pequeños trocitos de las distintas lesiones en diferentes fijadores para que después no resulte imposible la aplicación de algún método que nos fuera necesario. En este último caso haremos bien en recoger trocitos en formol al 10 o 12 por 100, en alcohol al 96 por 100 o absoluto, en líquido de Müller o en la mezcla de Orth (formol-Müller).

Los cortes pueden verificarse en congelación o después de inclusión en celoidina o parafina, aunque creemos que debe recomendarse la primera. Dada la homogeneidad de la textura nerviosa, el corte se verifica con gran facilidad por cualquiera de los procedimientos, y solamente cuando existan grandes focos de reblandecimiento correremos el riesgo de que se desprendan las partes reblandecidas en los cortes obtenidos por congelación, debiendo apelarse a la inclusión.

En cuanto a la coloración, tendremos en cuenta que al sistema nervioso han de aplicársele las mismas reglas que a los demás, y así deberemos hacer teñidos por el método de van Gieson para poner de manifiesto el conectivo; usaremos el

azul polícromo de Unna o el verde de metilo-pironina de Unna-Pappenhein para el estudio de las células plasmáticas; haremos aplicación, en los casos correspondientes, de los métodos para las fibras elásticas para la grasa, etc., pero nos limitaremos en este lugar simplemente a la exposición de los métodos más usuales y prácticos para la demostración de los elementos propios del sistema nervioso.

Para su descripción ordenada los clasificaremos en

Métodos que muestran la morfología de las neuronas.
Métodos especiales de los grumos cromáticos.
Métodos neurofibrillares y de las fibras nerviosas.
Métodos para la demostración de la neuroglia.
Métodos para el estudio de la mielina normal y patológica.

II. — Métodos morfológicos para la demostración de las neuronas

Método rápido de Golgi, modificado. — 1.° Induración de trozos pequeños (medio centímetro cuadrado a lo más), durante uno a tres días, en

Bicromato de potasa al 3 por 100.....	20 gramos.
Ácido ósmico al 1 por 100.....	5 —

2.° Lavado rápido (dos a cuatro segundos) en agua destilada.

3.° Inmersión por treinta horas en solución de nitrato de plata cristalizado al 0'75 por 100.

4.° Induración, por media hora, en alcohol de 40°.

5.° Montaje superficial en un bloque de parafina o entre dos trozos de médula de saúco, para efectuar las secciones microtómicas, que deberán ser espesas.

6.° Lavado de los cortes (que deben recogerse en alcohol de 40°) en alcohol de 40°, que se mudará seis u ocho veces durante media hora.

7.° Aclaramiento, por dos a cinco minutos, en la esencia de clavo.

8.° Traslación rápida al porta-objetos, donde se irrigarán con xilol (por algunos segundos) para quitar la esencia de clavo.

9.° Lubrificación de los cortes con bálsamo o resina damar disueltos en xilol.

10. Desecación subsiguiente de los cortes al descubierto, a fin de que el barniz se endurezca hasta lo hondo del tejido, y las células queden como incrustadas en cristal. La lenta desecación del barniz, así como un montaje a la manera ordinaria, estropean la coloración.

Este método de coloración produce excelentes preparados en la médula embrionaria, cerebro y cerebelo de mamíferos, en la retina, bulbo olfatorio, terminaciones nerviosas periféricas, gran simpático adulto, conductos glandulares, etc., etc. Tiñe de negro las células y particularmente los cilindros-ejes.

En vez del ácido ósmico, Hoyer, During (1895), Lachi y Dell Isola (1895), han propuesto la formalina, que posee casi las mismas propiedades indurantes que aquél, sin el inconveniente de obscurecer la coloración de las piezas.

El líquido de During se compone de:

Bicromato.....	3	gramos.
Agua.....	100	—
Formalina o formol.....	4 ó 6	—

Después de tres días de permanencia de las piezas (que no deben pasar de medio centímetro de espesor) en este líquido, se llevan al nitrato de plata (dos días), pasando nueva y sucesivamente por ambos líquidos, exactamente como en el método de impregnación doble aconsejado por nosotros.

Lachi y Dell Isola emplean una mezcla a partes iguales de bicromato al 10 por 100, y de formalina disuelta en agua en igual proporción. Lachi afirma que la inducación es todavía más rápida, añadiendo al baño un 10 por 100 de solución de ácido ósmico al 1 por 100.

La reacción negra se obtiene con estos líquidos bastante bien; no obstante, de nuestras experiencias, recaídas sobre todo en los centros nerviosos del gato recién nacido, resulta que el método a la formalina es bastante inferior, como finura y abundancia de células teñidas, al procedimiento usual de la mezcla osmio-bicrómica.

Método lento de Golgi. — Trozos de centro nervioso (cerebro,

cerebelo, etc.), indurados durante uno a dos meses en el líquido de Müller o en soluciones concentradas de bicromato de potasa, son llevados al nitrato de plata (solución del método anterior).

El tratamiento ulterior, como en el procedimiento rápido.

Este método tiñe bien las células piramidales del cerebro, corpúsculos de Purkinje del cerebelo, etc.; pero impregna mal e inconstantemente los cilindros-ejes. Se aplica siempre a los animales adultos.

Método de Golgi al bicloruro de mercurio. — Trozos de centros nerviosos, que fueron durante uno a más meses indurados en líquido de Müller, se abandonan durante diez a veinte días en una solución de sublimado corrosivo al 0'25 por 100. Esta solución debe cambiarse algunas veces, y todavía obra mejor prolongando su acción uno o más meses. Los cortes se lavan en agua, se deshidratan, aclaran y montan en bálsamo al descubierto. Las células nerviosas aparecen negras sobre fondo blanco.

Flechig ha mejorado este método tiñendo los cortes, una vez impregnados en negro por el mercurio, por una solución de extracto de madera roja del Japón.

Como el método es muy complicado e inseguro, no lo detallamos aquí.

Método de Cox. — Este autor ha modificado el procedimiento del bicloruro de mercurio en el sentido siguiente:

1.° Trozos frescos de centros nerviosos se colocan por dos o tres meses en este líquido:

Bicromato de potasa al 5 por 100..	20	gramos.
Solución de sublimado al 5 por 100.	20	—
Agua destilada.....	20 ó 40	—
Cromato de potasa al 5 por 100 con reacción fuertemente alcalina...	16	—

2.° Previa inclusión superficial en parafina, se efectúan cortes finos que se recogerán en alcohol de 36°.

3.° Lavado de los cortes en agua abundante.

4.° Inmersión de los mismos por algunos segundos; es decir, hasta que adquieran un tinte moreno o pardo, en solución concentrada de potasa o de potasa cáustica. Nosotros mezclamos

al agua de un pocillo de porcelana unas gotas de solución de sosa o de potasa al 30 por 100.

5.° Lavado por unos minutos de los cortes en agua abundante, a fin de extraer el álcali.

6.° Deshidratación y montaje como en el método de Golgi.

Este método da excelentes resultados en la corteza cerebral y asta de Ammon de mamíferos de uno a dos meses de edad. En los fetos y animales recién nacidos es ineficaz.

Método de Ehrlich al azul de metilo. — Aun cuando este método tiene poca o ninguna aplicación en Anatomía patológica, no estará de sobra dar una ligera noticia de él.

Se utiliza particularmente para investigar las terminaciones nerviosas; pero ha dado también resultados notables en la retina (Dogiel), y en los centros nerviosos de los invertebrados (Retzius). Nosotros mismos lo hemos usado con buen éxito en la coloración del gran simpático visceral (plexo de Auerbach, etc.).

La manera más sencilla de usar el azul de metileno consiste en aplicar sobre trozos frescos de tejido algunas gotas de solución concentrada de dicho color en agua salada (sal al 0'75 por 100). Al cabo de media a una hora, y procurando que las partes lubrificadas estén expuestas al aire, las terminaciones nerviosas aparecerán teñidas de un azul magnífico.

Como el color se desvanece pronto, urge fijarlo en seguida. Al efecto, Dogiel usa una solución saturada de picrato amónico adicionada (al 1 o 2 por 100) de ácido ósmico al 1 por 100. En este fijativo permanecerán las piezas veinticuatro horas. El examen se practicará en glicerina con picrato amónico.

Puede también emplearse como fijador, según el consejo de Bethe (1895), una solución al 10 por 100 de molibdato amónico, reactivo que tiene la propiedad de formar con el azul de metileno una combinación insoluble en el alcohol. En la retina y terminaciones nerviosas musculares, nosotros empleamos con buen éxito una mezcla de molibdato y ácido ósmico:

Solución saturada de molibdato.....	20 gramos.
Ácido ósmico al 1 por 100.....	5 —

En este líquido permanecen media hora los órganos nervio-

sos, se lavan después en mucha agua, se deshidratan rápidamente en alcohol, se aclaran en xilol y montan en damar

Coloración de los núcleos y cilindros-ejes. — Se logra aplicando, previa inducción en el líquido de Müller, cualquiera de los métodos de teñido al carmín, especialmente el picro-carminato, la cochinilla de Czokor, la hematoxilina, la nigrosina, la picronigrosina de Martinotti, etc.

Lowenthal aconseja un picro-carminato, particularmente eficaz para la coloración de las células y fibras nerviosas a saber:

Se comienza por disolver, en 100 gramos de agua, 0'05 de sosa cáustica, añadiéndose luego 0'4 de carmín; cuécese de diez a quince minutos la solución y se diluye con agua hasta obtener 200 cent. cúb.

En el líquido así obtenido, échase poco a poco una solución acuosa al 1 por 100 de ácido pícrico, hasta que el precipitado que se forma cese de disolverse. Reposado el color, se filtrará dos o tres veces y estará listo para usarse.

Método de Fayersztain. — 1.° Inducción en formol. Cortes en congelación.

2.° Disolución acuosa de ácido crómico al $^1/_4$ o $^1/_2$ por 100 de cinco a veinticuatro horas, como mordiente.

3.° Lavado, preferentemente en agua caliente, cambiándola varias veces durante diez minutos.

4.° Coloración en la hematoxilina de Weigert o Kultschitzky, que se expondrá con los métodos correspondientes al ocuparnos de la mielina, de dos a seis horas.

5.° Diferenciación posterior con permanganato potásico, como en el método de Pal.

Fúndase el método, en que empleando el de Weigert-Pal en piezas que no han sido tratadas por el alcohol y el éter en vez de colorearse la mielina se tiñe el axon o mejor el axoplasma, de color azul obscuro.

Método de Kaplan— 1.° Inducción en Müller tres meses o más. Inclusión en celoidina, cortes.

2.° Coloración durante tres días a 35° en una disolución, frescamente preparada, de antraceno y tinta al tanino y hierro (Grübler) al 10 por 100.

3.° Lavado en agua.

4.° Diferenciación como en el método de Weigert-Pal.

5.° Lavado.

6.° Coloración contraste con la disolución de fuchina al 1 por 1.000.

Deshidratación en alcohol absoluto, carbol-xilol, xilol, colofonia.

Los cilindros-ejes se presentan de color azul acero.

III. — Métodos especiales de los grumos cromáticos

Proceder de Nissl (1903). — 1.° Inducación en alcohol de 96°.

2.° Secciones sin inclusión. Para pegar las piezas al corcho se usará una solución concentrada de goma arábiga, que se solidificará en el alcohol.

3.° Inmérgense los cortes en este colorante:

Azul de metileno B.....	3'75	gramos.
Jabón de Venecia	1'75	—
Agua	1.000	—

Esta solución, que debe estar preparada con varios meses de anticipación, actuará en caliente por una o más horas. Una solución de azul de toluidina usada en las mismas condiciones da también buenos resultados.

4.° Enjúganse los cortes con papel chupón sobre porta objetos y se diferencian en:

Aceite de anilina.....	10	partes.
Alcohol de 96°	90	—

5.° Se enjugan nuevamente y se aclaran con aceite de Cayeput y después en bencina. En fin, conservación en colofonia al xilol.

Los grupos cromáticos adquieren tono azul intenso y los nucleolos aparecen también vigorosamente teñidos.

El método de Nissl puede simplificarse del modo siguiente:

1.° Trozos pequeños de centros nerviosos frescos se endurecen por cuatro a ocho días en el alcohol de 40° o absoluto. Inclusión en celoidina.

2.° Los cortes, que deben ser finos, se coloran por diez o más minutos en una solución saturada o muy concentrada de fuchina básica (Nissl), de azul de metileno B o de tionina (Lenhossék).

3.° Lavado de los cortes en alcohol de 40°, hasta que tomen un matiz azul-claro (tionina) o rosa (fuchina) y montaje en bálsamo. Si utilizamos la tionina, los grumos cromáticos aparecerán de violado-obscuro, los núcleos de azul y la substancia blanca de azul-pálido, casi incolora. Al nivel de la mielina suele aparecer un precipitado irregular de matiz rojo.

Método de Held. — 1.° Inducación en alcohol o en disolución saturada de ácido pícrico con el 2 por 100 de ácido sulfúrico, inclusión en parafina y cortes.

2.° Coloración en una disolución de 1 gramo de eritrosina en 150 gramos de agua destilada y dos gotas de ácido acético, calentando ligeramente durante uno a dos minutos.

3.° Lavado en agua.

4.° Coloración en una mezcla a partes iguales de disolución acuosa de acetona al 5 por 100 y el azul de metileno de Nissl. Se calienta hasta que no se aperciba olor a acetona y se deja enfriar el líquido con los cortes contenidos.

5.° Diferenciación de unos segundos hasta unos minutos en disolución acuosa de alumbre al 1 por 100, hasta que los cortes aparezcan de nuevo rojos.

6.° Lavado en agua, rápida deshidratación en alcohol, xilol, bencina y colofonia.

Los grumos de Nissl son azules, el protoplasma y núcleo ligeramente rojos y el nucleolo azul.

IV. — Métodos neurofibrillares y de las fibras nerviosas

Pueden dividirse en dos grupos, según que se basen en el empleo de colores de anilina o en la impregnación argéntica.

A) Procederes con colores de anilina.

Método de Bethe. — 1.° Bloques de tejido nervioso son fijados en solución acuosa de ácido nítrico (del 3 al 7 por 100).

2.° Alcohol de 36° de doce a veinticuatro horas.

3.° Inmersión durante medio o un día en:

Amoníaco (pes. esp. 0'95)	1 gramo.
Alcohol de 95°	8 —
Agua destilada	3 —

4.° Alcohol de 96°, por seis o doce horas.

5.° Inmersión de las piezas por varias horas en:

Ácido clorhídrico (pes. esp. 1'18)	1 cent. cúb.
Alcohol de 96°	10 —
Agua destilada	3 —

6.° Alcohol por algunas horas.

7.° Inmersión durante medio día en agua destilada.

8.° Durante un día abandónanse las piezas en una solución de molibdato amónico al 4 por 100.

9.° Lavado, por algunos segundos, en agua; después alcohol, xilol, parafina, etc.; corte de 10 μ, que se fijarán en el porta-objetos con albúmina glicerinada.

10. Extraída la parafina al xilol, lavados con alcohol, y, finalmente, mojados en agua, los cortes se llevan a la estufa a 58°, donde permanecen durante cuatro o diez minutos.

11. Arrojada el agua sobrante de los cortes se colorean éstos en solución de toluidina al 1 por 1.000. Acción de la estufa a 58° durante diez minutos.

12. Lavado con agua y tratamiento con alcohol absoluto hasta que las secciones no pierdan más color.

13. Aclaramiento en xilol y bálsamo.

Este método, sumamente inconstante y engorroso, presenta las neurofibrillas teñidas de color violado y algo granulosas. Se ha aplicado preferentemente al cerebelo, bulbo y médula. En los demás órganos da preparados demasiado pálidos y poco expresivos.

Proceder de Donaggio. — Actualmente se prefiere este método al de Bethe, por ser más constante y dar coloraciones más finas e intensas. Discrepa del de Bethe en varios particulares, sobre todo en la sustitución de la fijación nítrica con la fijación en piridina.

He aquí el «*modus operandi*»:

1.° Las piezas se sumergen en fresco, durante cuatro o seis días, en piridina pura.

2.° Lavado en agua durante varias horas para extraer el reactivo.

3.° Inmersión de las piezas en la solución de molibdato amónico al 4 por 100, a la que se añade una gota de ácido clorhídrico. Aquí permanecerán veinticuatro horas.

4.° Lavado, por varios minutos, en agua destilada e inclusión en parafina, según el proceder conocido.

5.° Los cortes, que deben ser de tres a siete, se pegan al porta-objetos con agua destilada y se desparafinan y deshidratan a la manera ordinaria.

6.° Llévanse después, puestos en porta-objetos y cubiertos de una gota de agua destilada, a la estufa, mantenida a 40°. El tiempo de esta inmersión oscila entre quince segundos y un minuto.

7.° Inmersión de los cortes en solución de tionina al 1 por 10.000 durante cinco a treinta minutos. En este líquido adquiere el preparado tinta violácea rojiza; puédese ya deshidratar, aclarar y montar; pero el autor recomienda un nuevo pasaje por el molibdato en esta forma:

8.° Lavado de los cortes por algunos segundos, en agua; acción del alcohol durante segundos también; nuevamente agua, renovada con rapidez y, finalmente, inmersión por quince minutos en la solución de molibdato.

9.° Lavado, deshidratación, montaje.

Las neurofibrillas se dibujan mejor que en los preparados de Bethe, pero la reacción es también inconstante, dependiendo de la habilidad que se tenga en mantener en los cortes justamente la cantidad de molibdato precisa para que tenga lugar la acción mordiente, sin dejar reactivo en exceso, que provocaría precipitados irregulares. Por lo demás, este proceder no da resultados aceptables sino en la médula espinal y

bulbo. En el cerebelo, cerebro, etc., es rarísimo obtener un preparado conveniente y comparable a los que se logran facilísimamente con el nitrato de plata.

B) Impregnación argéntica de las neurofibrillas.

Los procederes de impregnación argéntica llevan enorme ventaja, por la claridad y limpieza de la coloración, a todos los métodos de las anilinas; en general, son también más sencillos y constantes. Conócense hoy tres: el de Simarro, el de Bielschowsky y el nuestro; pero a la histología patológica sólo son aplicables los dos últimos.

Método del nitrato de plata reducido. — Las fórmulas usadas actualmente por nosotros son varias; pero las más provechosas son las siguientes:

Fórmula 1.ª — 1.° Piezas de 3 milímetros de espesor se sumergen, durante tres a cinco días, en nitrato de plata al 1'50 por 100. Estufa a 35°. La cantidad de líquido debe ser abundante con relación a las piezas.

La adición de un 10 a 20 por 100 de alcohol puede, en algunos casos, ser conveniente.

2.° Inmersión de los bloques previo rápido lavado en agua destilada en este líquido, donde permanecerán veinticuatro horas:

Ácido pirogálico o hidroquinona.....	1 a 2	gramos.
Formol.....	5 a 10	—
Agua.....	100	—

3.° Lavado rápido en agua destilada, inducración en alcohol, celoidina y cortes de mediano espesor.

Esta fórmula produce, sobre todo, buenos resultados en los embriones y animales recién nacidos y jóvenes (médula, bulbo, cerebelo y ganglios) y en el cerebelo y cerebro de los adultos. También es aplicable a los invertebrados, singularmente al «hirudo», donde impregna magníficamente las recias neurofibrillas de las células gangliónicas; pero en este caso debe aumentarse la proporción de nitrato de plata al 6 por 100.

Fórmula 2.ª — 1.° Fíjanse las piezas durante veinticuatro

horas en alcohol de 40° o absoluto. La adición al alcohol de un hipnótico (veronal, hidrato de cloral, etc.) acelera el tiempo de permanencia en la estufa y acaso acrecienta la constancia y regularidad de la reacción. Así, tras de la acción del alcohol, 50; veronal, 1, el baño argéntico debe obrar solamente cinco días.

2.° Trasládanse, reducidas a trozos de 2 ½ milímetros de espesor a la solución de nitrato de plata al 1'50 por 100, donde permanecerán de cinco a siete días. Estufa de 28 a 35°.

3.° Prévio lavado rápido en agua se sumergen en el reductor susodicho.

Esta fórmula colorea espléndidamente los cilindros-ejes medulados y amedulados y muchas arborizaciones nerviosas pericelulares.

Nuestras investigaciones prueban que la fórmula alcohólica impregna muy bien las terminaciones nerviosas motrices y sensitivas (corpúsculos de Pacini, Meissner, Krause, Meckel, etc.). Los mejores efectos se obtienen en el cerebro y cerebelo.

Fórmula 3.ª — Igual que la anterior, sólo que en vez de fijar las piezas en alcohol puro se fijan en

Alcohol absoluto	50 cent. cúb.
Amoníaco	V a X gotas.

El tiempo de permanencia en el nitrato será también de cinco a siete días; varía asimismo con la dimensión de los bloques y la temperatura de la estufa.

Conviene especialmente esta fórmula para colorear las neurofibrillas de la médula espinal y ganglios de los animales recién nacidos. También en el cerebelo y gran simpático suministra de ellos resultados. En el cerebro adulto debe rebajarse el amoníaco a dos o tres gotas.

En fin, cuando el fijador es débilmente alcalino (una a tres gotas por 50 cent. cúb. de alcohol), dicha fórmula es aplicable asimismo a las terminaciones nerviosas periféricas.

Los procederes que acabamos de exponer han sido usados con éxito, sobre todo el primero y el tercero, por diversos autores (van Gehuchten, Michotte, Lugaro, van Stricht, Besta,

Azoulay, Nageotte, Marinesco, Held, v. Lenhossék, Dogiel, O. y H. Rossi, Levi, Dustin, etc.); pero hay otras fórmulas que convienen en casos especiales.

Proceder a la piridina. — La piridina ha sido aconsejada por Lugaro y Held como fijador de las piezas destinadas al método del nitrato de plata reducido.

He aquí la fórmula que nosotros usamos para el estudio de la neurogénesis:

1.° Las piezas son sumergidas por veinticuatro horas en piridina pura.

2.° Lavado, cambiando varias veces el agua, durante seis horas.

3.° Alcohol de 96° por seis a doce horas.

4.° Lavado rápido en agua destilada para extraer el alcohol.

5.° Nitrato de plata al 1'50 en estufa a 35°, por cuatro o cinco días.

6.° Reducción en el baño piro-formólico.

7.° Alcohol, celoidina o parafina, etc.

Esta fórmula da, sobre todo, buen resultado en los embriones y nervios en vías de regeneración. En el adulto tiñe de preferencia las fibras nerviosas finas y las ameduladas.

En los animales jóvenes y adultos y, en general, cuando las piezas son algo voluminosas, la piridina produce graves deformaciones y vacuolas en la substancia gris. Para evitarlas sustitúyese la piridina pura por: alcohol, 20; piridina, 40. Una solución de piridina en agua, al 50 por 100, da también buenos resultados. Con esta modificación hemos trabajado de preferencia durante estos últimos años con ocasión de nuestras investigaciones sobre la degeneración y regeneración de los centros nerviosos (1). Las piezas se lavan también, durante horas, para descartar la piridina. La acción del nitrato de plata caliente (estufa a 35°) no pasará de cuatro días; si la temperatura llega a 40°, bastarán tres días.

Fijación al hidrato de cloral. — Una excelente coloración de las placas motrices, arborizaciones pericelulares de los centros,

(1) Véase *Cajal:* Estudios sobre la degeneración y regeneración del sistema nervioso. Dos volúmenes, Madrid, 1914.

cerebelo, etc., se obtiene fijando las piezas en hidrato de cloral (al 10 por 100) en vez de la piridina. Lavado ligero en agua destilada y alcohol amoniacal (alcohol, 50 gramos; amoníaco, IV gotas), por veinticuatro horas. Las demás operaciones, como en las fórmulas precedentes.

Método de Bielschowsky. — Este proceder es excelente para la coloración de las neurofibrillas del cerebro humano. Su ventaja más preciada consiste en que puede aplicarse a los cortes, que se tiñen con regularidad.

He aquí la fórmula última propuesta por el autor del método:

1.° Fijación en formol al 12 por 100 y cortes con microtomo de congelación.

2.° Veinticuatro a cuarenta y ocho horas en nitrato de plata al 2 por 100.

3.° Algunos minutos (quince a veinte) en un nitrato de plata amoniacal, preparado del siguiente modo: a 5 cent. cúb. de nitrato al 10 por 100 se añaden V gotas de una disolución de sosa al 40 por 100, y el precipitado que se forma se disuelve con la menor cantidad posible de amoníaco.

4.° Formol al 20 por 100 durante veinticuatro horas, después de un rápido lavado con agua destilada.

5.° Virado con baño de oro (III gotas de solución de oro al 1 por 100 en 10 cent. cúb. y II a III gotas de ácido acético) o platino.

6.° Fijación en hiposulfito al 5 por 100, al que se añade una gota de sulfito a saturación si se ha empleado el oro. Lavado abundante.

7.° Alcohol, bálsamo, etc.

Nueva modificación del método de Bielchowsky (1908). — 1.° Fijación en formol al 20 por 100.

2.° Lavado en agua por varias horas.

3.° Piridina pura, de veinticuatro a cuarenta y ocho horas.

4.° Lavado en varias aguas destiladas hasta que desaparezca el olor (veinticuatro horas o más).

5.° Secciones con el microtomo de congelación.

6.° Inmersión de los cortes por veinticuatro horas en la solución al 3 por 100 de nitrato de plata.

7.° Breve lavado en agua destilada.

8.° Inmersión de los cortes durante media hora en esta solución de nitrato de plata amoniacal.

Solución de nitrato de plata al 20 por 100..	5 cent. cúb.
Lejía de sosa al 40 por 100.....	V gotas.

El precipitado se disuelve añadiendo gotas de amoníaco; procúrese que no haya exceso de éste. Añádase después 20 centímetros cúbicos de agua destilada.

9.° Inmersión de los cortes durante algunos segundos, todos en agua destilada.

10. Reducción en la solución al 20 por 100 de formol.

En vez de cortar después de la inmersión en piridina, Doinikow propone seccionar primero y llevar los cortes, durante veinticuatro horas, a la piridina. La inmersión en el primer baño de plata se prolonga dos, cuatro o seis días.

V. — Métodos para la coloración de la neuroglia

Método de Weigert. — Mediante este método se obtiene una coloración azul específica de las fibrillas de las células neuróglicas, quedando incoloro el cuerpo mismo de éstas, cuyo protoplasma granuloso viene a ser el punto de entrecruzamiento de las citadas hebras. Tampoco se tiñen los corpúsculos epiteliales ni las espinas o apéndices penniformes de ciertos elementos en araña (células penniformes de la substancia gris).

He aquí el *modus faciendi:*

1.° Las piezas, no muy voluminosas, de centros nerviosos humanos (en los animales los resultados son muy inciertos), se induran previamente, ya en formol al 10 por 100, ya en bicromato al 5 por 100.

2.° Dichas piezas permanecen luego por ocho días en el líquido siguiente:

Agua.....	100	gramos.
Acetato de cobre.....	5	—
Ácido acético.....	5	—
Solución de alumbre de cromo.....	2'5	—
Formol.....	10	—

Esta solución se prepara disolviendo primeramente por coc-

ción en agua el alumbre y añadiendo después el ácido acético y el acetato de cobre finamente pulverizado.

3.° Inducración en alcohol, inclusión en celoidina y ejecución de cortes finos.

4.° Los cortes se llevan a un líquido reductor formado por la solución al 0'3 por 100 de hipermanganato potásico. En este licor permanecen diez minutos.

5.° Lavado rápido en agua y sumersión de los cortes en esta solución:

Cromógeno	5 gramos.
Ácido fórmico	5 —
Agua	100 —

Antes de usarlo se añaden a 90 partes de este licor 10 de una solución acuosa al 10 por 100 de sulfito de sosa.

6.° Lavado rápido en agua y coloración subsiguiente en solución concentrada de violado de metilo, a saber:

Violado de metilo disuelto a saturación en alcohol de 70°	100 gramos.
Solución acuosa de ácido oxálico al 5 por 100	5 —

7.° Fijación del color mediante la solución yodo-yodurada del método Gram (solución de yodo a saturación en yoduro de potasio al 2'5 por 100).

Este líquido se aplica durante algunos minutos sobre los cortes, previamente fijados en el porta-objetos y enjugados con papel secante.

8.° Decoloración de una mezcla a partes iguales de xilol y aceite de anilina.

9.° Absorción con papel secante del exceso de xilol y montaje en bálsamo o damar disueltos en este mismo menstruo.

Proceder de Anglade. — 1.° Las piezas se induran durante cuatro días en el líquido siguiente:

Solución acuosa al 7 por 100 de sublimado	1 volumen.
Líquido de Fol	3 —

2.° Lavado en agua corriente, dos horas.

3.° Deshidratación en alcohol o acetona. Inclusión en parafina.

4.° Los cortes se sumergen durante media a una hora en solución saturada de azul Victoria (de Grübler), que se mantendrá caliente, aunque sin llegar a la ebullición.

5.° Después de derramar el excedente de color, sométense los cortes a la solución de Gram:

Yodo	1 gramo.
Yoduro	2 —
Agua destilada	300 cent. cúb.

6.° Diferenciación en

Xilol	1 gramo.
Aceite de anilina	2 —

7.° Montaje en bálsamo del Canadá.

Las fibras neuróglicas aparecen teñidas de violeta intenso, así como los núcleos. El resultado es análogo al del método Weigert.

Método de Ranke.—1.° Las piezas nerviosas indúranse en cualquier líquido endurecedor, y de preferencia en el formol.

2.° Inclusión en celoidina o parafina. Los cortes no deben pasar de 15 μ.

3.° Montados en porta-objetos, se enjugan con papel secante, evitando los pliegues.

4.° Tratamiento de los cortes por el alcohol metílico para disolver completamente la celoidina. Enjugamiento de los mismos.

5.° Coloración con una solución filtrada al 1 por 100 de Victoria-blau (Grübler) durante una hora en estufa y varias horas más a la temperatura ordinaria. No hay inconveniente en abandonar el preparado en la estufa por un día.

6.° Diferenciación en el líquido de Lugol como en el método de Weigert para la coloración de la fibrina. Randoni, que ha modificado un tanto esta operación, aconseja:

a) Enjugar los cortes con papel chupón.

b) Verter sobre ellos unas gotas de un líquido, compuesto

de yoduro potásico al 5 por 100 y de yodo a saturación, que debe obrar algunos segundos.

c) Nueva desecación del corte con papel chupón.

d) Disolución del exceso de color en esta mezcla:

Aceite de anilina.....	1 gramo.
Xilol.....	1 1/2 —

e) Nueva desecación de los cortes.

f) Lavado repetidas veces con xilol.

g) Desecación del corte y después bálsamo o colofonia en bencina.

Método de Alzheimer.—1.° Induración del alcohol (celoidina, etcétera) o también en el mordiente de Weigert, en cuyo caso se hacen las secciones con el microtomo de congelación.

2.° Inmersión de los cortes de dos a doce horas, en solución de ácido fosfomolíbdico. (En los cortes de la celoidina una hora, no más).

3.° Lavado en agua durante diez o más minutos.

4.° Coloración en este líquido de Mann, por una hora:

Azul de metileno en solución acuosa al 1 por 100.....	35 cent. cúb.
Eosina (solución acuosa al 1 por 100).	45 —
Agua destilada.....	100 —

5.° Lavado en agua durante diez minutos. (Si se usó el mordiente fijador de Weigert, sólo medio minuto).

6.° Paso rápido de los cortes por el alcohol absoluto. Xilol y bálsamo.

Este bello método colorea la neuroglia en rojo y los vasos en azul.

Método de Cajal al formol-urano. — 1.° Piezas nerviosas de 2 a 2'5 milímetros de espesor son fijadas desde ocho a veinticuatro horas en:

Nitrato de urano.....	1 gramo.
Formol.....	15 —
Agua.....	100 —

Este baño debe actuar de veinticuatro a cuarenta y ocho horas. Si las piezas pertenecen a animales jóvenes y se sacan

entre las ocho o veintidós horas, se obtendrá la coloración del *aparato reticular* de Golgi.

2.° Previo rápido lavado de las piezas, se sumergen en nitrato de plata al 1'5 por 100 (si las piezas son pocas o de escasa extensión, puede descenderse al 1 y hasta al 0'75 por 100). La acción de este baño debe durar veinticuatro horas por lo menos, a fin de que el nitrato tenga tiempo de penetrar en el espesor de la pieza y sufrir un principio de reducción en presencia de reliquias del formol. De ordinario dejamos las piezas en nitrato, de treinta y seis a cuarenta y ocho horas.

3.° Después de lavadas dos veces en agua destilada para quitar el nitrato superficial (esta maniobra debe durar algunos segundos), se sumergen en este reductor:

Hidroquinona.....	2 gramos.
Formol.....	6 —
Agua.....	100 —
Sulfito de sosa anhidro.....	0'15 a 0'25 —

es decir, cantidad suficiente para que el baño adquiera a los pocos instantes un color amarillo. El exceso de álcali, patentizado por el tono pardo-negro del reductor, suele dar malos resultados. Un exceso de formol tampoco es favorable.

4.° Transcurridas ocho a doce horas, sácanse las piezas del reductor, se lavan rápidamente y se induran en alcohol. Englobamiento en celoidina, etc.

Las células de neuroglia preséntanse bien teñidas, a partir de una zona cortical. En ciertos parajes imprégnanse solamente los *gliosomas*. Con particular energía suelen teñirse, sobre todo en los animales jóvenes, los pedículos vasculares.

Método del sublimado-oro (Cajal, 1913). — 1.° Piezas frescas de cerebro humano se induran desde dos a seis días en este líquido:

Formol.....	14 gramos.
Agua destilada.....	100 —
Bromuro de sodio (o nitrato de amoníaco).....	2 —

2.° Cortes por congelación que no bajen de 20 μ de espesor.

3.° Previo lavado rápido en agua destilada, sumérgense las secciones en el siguiente baño:

Cloruro de oro moreno (Merck) al 1 por 100.....	10	cent. cúb.
Sublimado (recién preparado) al 5 por 100.....	8 a 10	—
Agua destilada.....	50	—

Aquí permanecerán (en la obscuridad o a media luz) de cuatro a ocho horas, hasta que adquieran tono púrpura intenso.

4.° Lavados en agua destilada, llévanse los cortes a este baño fijador:

Hiposulfito de sosa al 5 por 100..	10 cent. cúb.
Bisulfito sódico.....	II o III gotas.

5.° Lavado de los cortes en alcohol al 50 por 100. Después se los extiende en el porta-objetos, donde son enjugados con papel filtro bien fino y limpio. En fin, deshidratación en alcohol absoluto, esencia de orégano, xilol y bálsamo.

Si la reacción sale bien, las células de neuroglia aparecen teñidas en rojo purpúreo, y en rosa o violado claro las neuronas. Las fibras nerviosas son poco o nada visibles.

Este proceder da, sobre todo, buenos resultados en el cerebro humano adulto. Obtiénense, no obstante, también preparaciones aceptables en el cerebro del gato y perro, menos buenas en el conejo.

Método de Achúcarro al tanino y plata amoniacal. — El método del tanino y la plata amoniacal de Achúcarro, que tiñe especialmente las fibrillas conectiva recticular o primitiva, da también resultados excelentes en la coloración de la neuroglia protoplásmica y fibrosa. La fórmula más constante para la neuroglia protoplásmica de la corteza cerebral es la recientemente aconsejada por el autor:

1.° *Fijado.* — Trozos de un espesor no mayor que dos o tres milímetros se mantendrán, durante dos o tres días, en una solución de formol al 20 por 100, a la que se haya añadido el amoníaco necesario para obtener reacción alcalina con el papel de tornasol.

2.° *Secciones.* — No deben exceder de diez micromilímetros de espesor.

3.° *Mordiente.* — Se calientan los cortes, bien extendidos, en una solución acuosa de tanino puro al 10 por 100, hasta desprendimiento de vapores durante cinco minutos.

4.° *Lavado.* — Después de enfriado el líquido mordiente, se lavan los cortes, uno por uno, en agua destilada con dos gotas de amoníaco, hasta que recupere su flexibidad perdida en el baño del mordiente.

5.° *Impregnación.* — Se lleva a cabo en una solución de plata amoniacada (según Bielschowsky), muy diluída (tres o cuatro gotas de la solución madre en diez centímetros cúbicos), y cuando la substancia blanca empieza a teñirse, se da por terminada la impregnación.

6.° *Reducción.* — Se efectúa en el mismo líquido que sirve para el fijado y debe durar cinco minutos.

Después de lavado en agua destilada, pueden dorarse los cortes en una solución diluída de cloruro de oro o montarse directamente en bálsamo después de alcoholes y xilol.

Método de Del Río-Hortega. — 1.° Fijación de las piezas nerviosas en el formol-bromuro amónico, según la fórmula del método de Cajal al sublimado-oro que acabamos de describir. La acción del fijador debe ser de doce días en adelente. Los cortes se obtienen en el aparato de congelación.

2.° Abundante lavado en agua destilada, cambiándola dos o tres veces.

3.° Inmersión en la disolución de carbonato argéntico que se prepara añadiendo a 50 cent. cúb. de la disolución de nitrato de plata al 10 por 100, un volumen igual de la disolución acuosa saturada en frío de carbonato de litina; se deja sedimentar el precipitado, se añaden 200 a 300 cent. cúb. de agua destilada y después de agitar se vuelve a sedimentar y a separar el líquido; se añaden 60 cent. cúb. de agua y se vierten gotas de amoníaco hasta completa redisolución del precipitado, completando con agua destilada el volumen de 250 cent. cúb. De este líquido se ponen unos 5 cent. cúb. en un vasito de cristal con tapadera, se introducen los cortes, y después de cubrir se calientan a 45 o 50°, hasta que adquiera color amarillo parduzco lo mismo que el líquido, lo que se consigue en algunos minu-

tos a esa temperatura, en unas doce horas a 37° y en veinticuatro horas o más en frío. Mientras se calienta, se debe agitar el vasito para que la coloración se haga con uniformidad y no debe descubrirse el vasito para que no se forme en contacto del aire una película metálica que ensucie los cortes.

4.° Antes de que el líquido haya comenzado a enfriarse, se llevan los cortes con una aguja de cristal al agua destilada donde se lava unos instantes, menos de un minuto, para que la reducción tenga lugar en el baño siguiente, pero lo mejor posible, para evitar el exceso de plata, que dificultaría también la reducción.

5.° Reducción en un baño de formol al 20 por 100, libre de ácidos mediante la creta. Se verifica en uno o dos minutos, y aunque se formen nubecillas blanquecinas por lavado deficiente de la plata, no importa para la obtención de buenas preparaciones.

6.° Abundante lavado en agua destilada.

La coloración está terminada y pueden ser montadas las preparaciones, pero si se quiere un mayor vigor de las partes teñidas se practicará un dorado del siguiente modo:

7.° Disolución de cloruro de oro amarillo al 1 por 500 a 45° hasta que los cortes adquieran color violáceo.

8.° Lavado en agua destilada.

9.° Fijación en hiposulfito de sosa al 5 por 100 durante un minuto.

10. Lavado, deshidratación, aclaramiento en esencia de clavo, carbol-xilol y mejor en ácido fénico, 5 cent. cúb.; xilol, 45 centímetros cúbicos, y creosota pura, 50 cent. cúb.; bálsamo.

Con este método se consiguen excelentes impregnaciones de la neuroglia protoplásmica y fibrosa, de la substancia colágena de las fibras de reticulina, de la fibra muscular, de la materia amiloidea y de otras numerosas estructuras. La coloración de la neuroglia protoplásmica sólo se obtiene en piezas que no hayan permanecido en el fijador más de veinte días. Si en vez del fijador formol-bromuro de Cajal se usa el formol al 10 por 100, las secciones de las piezas nerviosas dan, no la coloración dela neuroglia, sino la de los cilindros-ejes.

VI.—Métodos para la demostración de la mielina normal y patológica

Como es bien sabido, la degeneración walleriana consiste en la degeneración de las fibras nerviosas separadas de la célula de origen que constituye su centro trófico. Esta degeneración se traduce en una porción de transformaciones de los cilindros-ejes hasta su desaparición, pero en las fibras meduladas ésta va seguida además de la alteración de la mielina, que se transforma en verdaderas substancias grasas primero y después desaparece también por completo.

Los procedimientos que demuestran las alteraciones de la mielina pueden ser divididos en dos grupos: el primero, formado por los que pudiéramos llamar *negativos o tardíos,* basados en el teñido de la mielina normal para que destaquen sin teñir aquellas porciones del tejido nervioso que perdieron por completo la mielina, mientras que en el segundo incluímos aquellos métodos que, por teñir la grasa y no la mielina normal, señalan dónde se encuentra ésta en vías de degeneración y pueden ser designados *positivos* o *precoces.*

A) Procederes negativos o tardíos.

Método de Weigert. — Constituye el método clásico y quizás es el que proporciona mejores resultados. Su autor ha hecho una gran cantidad de modificaciones de su proceder primitivo pero nosotros nos limitaremos a exponer el definitivo.

1.° Induración en formol de dos a tres días.

2.° Permanencia de cuatro a seis días en el primer mordiente.

Bicromato potásico.....	5 gramos.
Fluoruro de cromo.....	2'5 —
Agua.....	100 cent. cúb.

Cuézase y fíltrese.

3.° Sin lavar se induran los bloques en alcoholes de concentración creciente, en la obscuridad.

4.° Inclusión en celoidina. Después de englobados los bloques en celoidina e indurada la capa superficial al aire, se introducen los bloques encastrados no en alcohol, como se hace corrientemente, sino en el líquido siguiente.

5.° Segundo mordiente, veinticuatro horas a 37°.

Acetato neutro de cobre.....	5	gramos.
Fluoruro de cromo	2'5	—
Agua.....	100	cent. cúb.

Cuézase y añádase 5 cent. cúb. de ácido acético al 36 por 100 aproximadamente.

6.° Inmersión en alcohol de 70 a 80 por 100. Obtención de los cortes.

7.° Coloración de veinticuatro horas en la hematoxilina siguiente:

I. Hematoxilina.....	1	gramo.
Alcohol de 96 por 100.....	100	cent. cúb.
II. Licor de sexquicloruro de hierro.	4	—
Agua.....	100	—

Al usarlas mézclense partes iguales de ambas disoluciones.

8.° Lavado de media a una hora o más.

9.° Diferenciación hasta clara distinción de las substancias blanca y gris, mejor al microscopio en el siguiente líquido:

Ferricianuro potásico.....	2'5	gramos.
Bórax.....	2	—
Agua	100	cent. cúb.

10. Abundante lavado en agua, deshidratación en alcohol absoluto. Carbolxilol, xilol y bálsamo.

Las vainas de mielina aparecen de color negro azulado, destacando admirablemente del fondo.

Método de Pal. — Es una simplificación del precedente, al que tiende a sustituir de día en día.

1.° Los cortes, sin previa inmersión de las piezas en la solución de cobre, se llevan directamente del microtomo a la solución de hematoxilina.

Hematoxilina.....	1 gramo.
Alcohol absoluto.....	10 cent. cúb.
Agua.....	100 —

Añádase 1 cent. cúb. de la disolución acuosa saturada de carbonato de litina, donde permanecerán de seis a doce horas.

La acción de la estufa favorece la coloración, que se obtiene ya, bajo 37°, en menos de una hora.

2.° Lavado, por algunos minutos, en agua común que contenga 2 cent. cúb. por 100 de una solución saturada de carbonato de litina.

3.° Inmersión de los cortes, por quince a treinta segundos, en una solución al 0'25 por 100 de hipermanganato de potasa, donde toman un color pardo.

4.° Tratamiento por el líquido decolorante siguiente:

Sulfito de potasa.....	1 gramo.
Ácido oxálico.....	1 —
Agua destilada.....	200 —

En este licor, que debe estar recientemente preparado, se decoloran los cortes, resultado que se obtiene al cabo de cinco a quince minutos.

5.° Lavado de los cortes en agua abundante.

6.° Coloración subsiguiente de fondo en picro-carminato, o carmín borácico, o litio-carmín.

7.° Lavado, deshidratación, esencia de bergamota o creosota (si se quiere dejar la celoidina) y bálsamo al xilol.

Con la mira de hacer más fuerte el color de las fibras medulares finas, propensas siempre a palidecer bajo la acción de los decolorantes, hemos modificado un tanto el proceder de Pal: 1.°, reforzando el baño de hipermanganato (que elevamos del 0'25 al 0'5 por 100); 2.°, adicionando las operaciones con otra que consiste en sumergir los cortes por doce horas en bicromato de potasa al 5 por 100 antes de llevarlos a la hematoxilina. Este baño, destinado a reponer el tanto de cromo que los cortes han perdido durante su permanencia en alcohol, ha sido ya propuesto, aunque en distinta forma, por ciertos autores. Sin él nos exponemos a obtener coloraciones grises y muy incompletas, particularmente si las piezas se han indurado en el

bicromato menos de dos meses. El baño de bicromato es todavía más necesario cuando las piezas, después de induradas, han permanecido mucho tiempo en el alcohol. Si acabada la decoloración en la solución de sulfuro o de sulfito, adicionada de ácido oxálico, los cortes se mostraran demasiado pálidos, no debe vacilarse en repetir nuevamente las operaciones, trasegando los cortes bien lavados otra vez al bicromato (al 4 o 5 por 100) y tratándolos como la primera vez, es decir, por la hematoxilina y líquidos decolorantes.

Método de Kultschizky o de Kultschizky-Wolters. — 1.° Induración en líquido de Müller o de Erlicki. También cabe usar la fijación en formalina a condición de servirse después del mordiente rápido de Weigert.

2.° Alcohol, inclusión en celoidina. Microtomo.

3.° Coloración de los cortes, de doce a veinticuatro horas, en esta mezcla:

Solución alcóholica al 10 por 100 de hematoxilina.....	10 gramos.
Solución acuosa al 2 por 100 de ácido acético.....	90 —

4.° Paso directo de los cortes a este baño diferenciador, donde permanecerán varias horas hasta que la coloración resulte satisfactoria (se puede comprobar de hora en hora al microscopio).

Solución saturada de litina.....	100 gramos.
Solución al 1 por 100 de ferricianuro de potasio.....	10 —

5.° Lavado en agua abundante.

6.° Alcohol, xilol, bálsamo.

Este método es hoy muy empleado a causa de su certeza y de poder aplicarse mejor que el de Weigert-Pal a extensas secciones de los centros nerviosos. En efecto, el paso de los cortes por el hipermanganato y el baño de sulfito (proceder de Pal) les presta una fragilidad notable, que se evita con el licor diferenciador litinado.

Si en vez de piezas fijadas en líquido Müller nos servimos

de órganos tratados por el formol y seccionados con el microtomo de congelación, se someterán los cortes por media hora a una solución a $^1/_2$ por 100 de ácido crómico, que se calentará hasta producir vapores.

También se aplica con ventaja, después de la fijación en formol, el mordiente rápido de Weigert: bicarbonato de potasa, 5; fluorcromo, 2'5; agua destilada, 100. Este mordiente, en que se sumergen las piezas (no los cortes), actuará durante cinco días en estufa.

Si deseáramos descartar el color amarillento del fondo en que destacan coloradas en violado las fibras meduladas, recurriremos a la modificación de Wolters, que consiste en someter los cortes, después de teñidos en la hematoxilina acética, al líquido de Müller (unos minutos), y luego al hipermanganato potásico (como en el método de Pal).

Proceder de Nageotte (1909). — 1.° Fijación de las piezas en el líquido siguiente, que debe actuar uno o más días:

Formol.....	100 gramos.
Agua.....	300 —
Sulfato de sosa hidratado.....	10 a 70 —

2.° Los cortes con el microtomo de congelación colocándose en láminas de cristal, donde se desengrasan mediante un rápido lavado en alcohol absoluto.

3.° Coloración en porta-objetos con la hemateína de Mayer, que debe actuar en estufa y bajo cámara húmeda media hora.

4.° Después del lavado de los cortes en agua, son éstos diferenciados en la solución decolorante de Weigert (ferricianuro, 2'5; agua, 100; bórax, 2) más o menos diluída.

5.° Lavado y montaje en bálsamo como de ordinario.

Este método da también buenos resultados, decolorando por el proceder de Weigert-Pal. La ventaja más importante del método de Nageotte, estriba en que treinta horas después de la recepción de las piezas cabe ya obtener excelentes coloraciones de la mielina, cuando, según es sabido, usando el proceder ordinario de Weigert hay que esperar dos o tres meses.

Método de Spielmeyer. — 1.° Inducación en formol treinta días y cortes en congelación.

2.° Inmersión de seis horas en disolución de alumbre de hierro y amonio al 2'5 por 100.

3.° Lavado en agua.

4.° Alcohol al 70 por 100 diez minutos.

5.° Coloración en hematoxilina vieja: 5 partes de una disolución de hematoxilina en alcohol absoluto al 10 por 100 y 100 de agua destilada. De doce a veinticuatro horas.

6.° Lavado en agua.

7.° Diferenciación en el mismo mordiente de alumbre de hierro media hora o más, observando al microscopio, intercalando lavados en agua.

8.° Lavado en agua, deshidratación, xilol y bálsamo.

Si la coloración no resulta bien se repite en los mismos cortes.

Proceder de Cajal al cloruro de oro. — 1.° Inducación por uno o más días en formol al 10 por 100.

2.° Secciones con el microtomo de congelación.

3.° Inmersión de los cortes durante una o más horas en alcohol amoniacal. (Alcohol de 36°, 50; amoníaco, V gotas). Puede emplearse también con resultado el formol amoniacal, el acetato de cobre amoniacal, el bórax y otras substancias alcalinas.

4.° Lavado de los cortes en agua destilada.

5.° Inmersión de los mismos, durante cuatro o más horas, hasta que aparezcan teñidos de violado obscuro o rojo violáceo, en una solución de cloruro de oro al 1 por 4.000 o por 5.000. El líquido debe exhibir un tono ligerísimamente pajizo. Lo más cómodo para prepararlo es añadir a 100 cent. cúb. de agua destilada 2 a 5 cent. cúb. de una solución áurica al 1 por 100. Para acelerar la reacción, nosotros usamos la estufa a 35°.

6.° Lavado en agua abundante para extraer el cloruro de oro libre; deshidratación y montaje en bálsamo.

Si se desea un fijado muy sólido, sométanse los cortes, antes del lavado, al hiposulfito de sosa.

Las fibras de mielina se presentan coloreadas de rojo vivo o violado rojo, destacando muy bien sobre el fondo general incoloro. Este método, de gran sencillez y constancia, da buenos resultados, tanto en los animales como en el hombre. Sólo

adolece del defecto de presentar a menudo demasiado pálidas las regiones marginales de los cortes.

Método de Freud. — 1.° Inducración en líquido de Müller.

2.° Coloración, de tres a cinco horas, en una solución de cloruro de oro al 1 por 100, adicionada de igual volumen de alcohol de 95°.

3.° Lavado en agua.

4.° Sumersión, durante dos o tres minutos, en

Sosa cáustica.....	1 gramo.
Agua.....	6 —

5.° Lavado en agua.

6.° Inmersión, por cinco a quince minutos, en solución al 10 por 100 de yoduro de potasio.

7.° Lavado, deshidratación, aclaración, bálsamo.

Las fibras medulares se tiñen de violeta, rojo o azul, pero con alguna inconstancia.

Método de Azoulay (1895). — Este método tiñe bien la mielina y tiene la ventaja de ser muy sencillo y constante.

1.° Cortes muy finos procedentes de piezas induradas en líquido de Müller y englobadas en celoidina, se recogen y lavan cuidadosamente en agua destilada para arrastrar el alcohol.

2.° Inmersión, de cinco a diez minutos, en ácido ósmico al 1 por 500.

3.° Lavado rápido en agua.

4.° Los cortes se llevan a una solución de tanino de 5 a 10 por 100, donde permanecerán por unos cinco minutos. Es conveniente proceder en caliente, flameando con la lámpara el recipiente que contiene el baño de tanino, hasta que aparezcan vapores.

5.° Lavado en agua abundante por algunos minutos.

6.° Doble coloración con el carmín o la eosina acuosa.

7.° Deshidratación, aclaramiento y montaje en bálsamo.

La substancia blanca se presenta de color negro azulado, y morena o incolora la substancia gris.

Si por efecto del excesivo espesor de los cortes la coloración fuese muy obscura, se decoloran por unos minutos en el líquido sulfuroso oxálico de Pal.

Simarro aconseja un método análogo, pero en el cual el ennegrecimiento de la mielina se logra con el ácido pirogálico. Las piezas, antes del englobamiento en celoidina, deben indurarse en bicromato y después en ácido ósmico.

B) Procederes positivos o precoces.

Método de Marchi. — Trozos no muy grandes de centros nerviosos se induran por ocho días en líquido de Müller. Al cabo de este tiempo se llevan a la mezcla siguiente, donde permanecerán otra semana:

Líquido de Müller.....	2 partes.
Acido ósmico al 1 por 100.....	1 —

Las piezas se lavan, durante veinticuatro horas, en agua corriente (o en agua que se cambiará varias veces), a fin de arrastar el ácido ósmico, y se induran en alcohol. Previa inclusión en celoidina, se practicarán cortes que no deben teñirse con ningún colorante y que se montarán en bálsamo.

Este método es excelente para reconocer las degeneraciones secundarias que acaecen en los centros nerviosos, después de la destrucción o de la ablación de los focos grises o de la sección de los sistemas de fibras meduladas. Generalmente se sacrifica el animal catorce o dieciséis días después de practicada la experiencia. Los cortes, examinados al microscopio, presentan los tubos nerviosos sanos teñidos de gris o de moreno pálido, mientras que los degenerados exhiben rastros o cadenas de gotas grasientas coloradas en negro intenso.

El método de Marchi podrá también emplearse en el hombre siempre que las lesiones nerviosas hayan acarreado la muerte en un plazo de diez a veinte días. Transcurrido más tiempo, el contraste entre las partes degeneradas e indemnes desaparece por absorción de la mielina. En este caso debe intentarse el método de Weigert-Pal, que mostrará coloreadas las fibras sanas e incoloras las degeneradas.

Método de Benda. — Consiste en la mezcla de los dos procedimientos generales descritos, puesto que la mielina no degenerada se pone de manifiesto por el método de Weigert, en tan-

to que por medio del rojo escarlata tiñe la que se halla en vías de degeneración.

1.° Inducación en formol y cortes en congelación.

2.° Método de Weigert para la mielina.

3.° Coloración con el rojo escarlata.

La mielina aparece en negro azulado y la grasa en rojo, sirviendo este método solamente como de orientación.

CAPÍTULO XII

I. — Aparato locomotor

Como se ha dicho en la parte general, a propósito de la decalcificación, no se debe realizar ésta sin que previamente se haya verificado la fijación. Los procedimientos preferibles para la fijación son el formol-Müller, o como recomienda Schmorl, primero formol y después Müller, huyendo del alcohol y sublimado porque retrae mucho los cartílagos y produce arrugas.

Respecto a los modos de verificar la decalcificación, nos remitimos a lo dicho en la parte general.

La decalcificación puede ser completa e incompleta, según que se quiten por completo las sales de cal o se deje aquella cantidad de dichas sales que es compatible con la realización de los cortes. Este segundo procedimiento permite un juicio claro sobre el contenido en sales de cal en los procesos patológicos que van acompañados de alteraciones en la calcificación.

Para verificar la decalcificación incompleta se ponen trozos de hueso en líquido de Müller, donde permanecerán el tiempo suficiente para que se puedan verificar los cortes con una navaja, como si se tratara de una madera dura, sin estar completamente decalcificados; se lavan bien en agua, se induran en alcoholes de concentraciones crecientes, se incluyen en celoidina y se verifican los cortes. Las partes que conservan sales de cal se presentan con un aspecto uniforme y brillante que resalta mucho del aspecto fibroso de las partes que perdieron

por completo las sales de cal, en las preparaciones sin colorear. Todavía aparece más clara la diferencia si se ponen los cortes en carmín amoniacal (6 gotas en 100 cent. cúb.) durante seis a doce horas y se observa en glicerina, pues las partes calcificadas resultan intensamente teñidas.

Las preparaciones incompletamente decalcificadas pueden ser teñidas con hematoxilina-eosina, mostrándose los núcleos azules, las partes calcáreas según el grado de la decalcificación del color gris azulado al azul y el tejido osteoide rojo o amarillento. El van Gieson tiñe las partes calcificadas en amarillo y las osteoides en rojo brillante. Pommer hacía una nitratación de los cortes poniéndolos de quince a treinta minutos al sol con disolución acuosa de nitrato de plata al 2 o 5 por 100, lavando en agua, fijando en hiposulfito sódico al 10 por 100 de uno a dos minutos; después de un buen lavado teñía con hematoxilina-eosina; las partes calcificadas se tiñen en negro intenso, las osteoides en rojo, los núcleos en azul y lo mismo el cartílago.

También se pueden diferenciar las partes calcificadas y osteoides en los huesos completamente decalcificados por los procedimientos de Pommer y Schmorl.

Método de Pommer. — 1.° Induración en líquido de Müller.

2.° Decalcificación en líquido de Ebner: 100 cent. cúb. de la disolución de cloruro de sodio al 10-15 por 100, con 1 a 3 centímetros cúbicos de ácido clorhídrico oficinal, con lavado posterior de varias horas en agua corriente y tres a seis días en solución salina medio saturada, alcoholes crecientes en concentración.

3.° Cortes sin incluir.

4.° Coloración de doce a dieciocho horas en disolución acuosa de violeta de metilo al 0'002 por 100, o en disolución acuosa de dalia al 0'004 por 100, o en disolución acuosa de safranina al 0'016 por 100.

5.° Lavado.

6.° Observación en glicerina, apareciendo teñidas solamente las partes calcificadas.

Método de Schmorl — Consiste en la aplicación del método de Best para el glucógeno.

1.° Fijación en formol.

2.° Decalcificación en disolución acuosa de ácido nítrico o en formol con ácido fórmico.

3.° Tratamiento por el sulfito sódico.

4.° Abundante lavado.

5.° Cortes en congelación.

6.° Coloración por el método de Best (véase glucógeno).

Las partes calcificadas se tiñen en rojo y las demás no, o sólo toman una tinta rosácea.

Las fibras de Sharpey se ponen de manifiesto, observando los cortes de huesos decalcificados, según Ebner, en disolución saturada de cloruro de sodio o disolución concentrada de ácido clorhídrico, diafragmando mucho el microscopio.

Método de Kölliker. — 1.° Los cortes de huesos decalcificados se colocan en ácido acético hasta que se vuelvan transparentes.

2.° Teñido durante quince segundos a diez minutos en disolución acuosa saturada de carmín de índigo.

3.° Lavado en agua.

4.° Observación en glicerina, mostrándose las fibras de Sharpey rojas y la substancia fundamental azul.

También se tiñen con los métodos neurofibrillares.

Método de Schmorl para la demostración de las lagunas óseas y conductos calcóforos en huesos decalcificados. — 1.° Trozos de hueso lo más finos que sea posible se fijan en formol y se indu-ran en líquido de Müller de seis a ocho semanas, a la tempe-ratura de la habitación, y tres a cuatro en la estufa. También se pueden emplear otros métodos de fijación, menos el subli-mado, que proporciona resultados inseguros.

2.° Lavado en agua durante veinticuatro horas.

3.° Si los huesos proceden de casos de osteomalacia y raqui-tismo, en ocasiones se puede prescindir de la decalcificación; pero en todos los demás casos debe practicarse, valiéndose de cualquiera de los procedimientos descritos, prefiriendo para los huesos de niño el alcohol clorhídrico.

4.° Inclusión en celoidina o parafina o cortes en congelación.

5.° Los cortes, que han de ser lo más finos que consienta el material, se llevan diez minutos al agua.

6.° Coloración de tres minutos en 1 cent. cúb. de una diso-lución concentrada de tionina en alcohol al 50 por 100 y 10 cen-tímetros cúbicos de agua destilada, o cinco minutos en una

disolución acuosa concentrada de tionina, mezclada con su mismo volumen de agua.

7.° Lavado en agua.

8.° Alcohol, uno a dos minutos.

9.° Lavado en agua.

10. Diferenciación en disolución acuosa concentrada de ácido fosfo-wolfrámico; en caso de necesidad puede emplearse el ácido fosfo-molíbdico, aunque proporciona peores resultados. La diferenciación se consigue en pocos segundos, pero no perjudica el que los cortes permanezcan más tiempo en este líquido. Los cortes se transportarán con aguja de cristal.

11. Lavado en agua hasta que los cortes tomen un color azul celeste, de cinco a diez minutos, y tampoco daña un lavado más prolongado.

12. Fijación de la coloración en amoníaco diluído al 1 por 10.

13. Directo transporte a alcohol de 90 por 100, cambiado dos veces; deshidratación, carbolxilol, bálsamo.

Si la substancia fundamental resulta muy coloreada, se tratan los cortes con alcohol clorhídrico cinco minutos y después se lavan en agua.

Las paredes de las lagunas óseas y conductos calcóforos resultan de color negro azulado; la substancia fundamental, de color azul claro, a veces azul verdoso o rojo. Los elementos celulares muestran una coloración azul difusa.

Para el estudio de las fibrillas óseas recomienda la siguiente modificación:

1.° Fijación en formol, inducación en Müller, decalcificación en ácido nítrico y cortes en congelación, mejor que inclusión en celoidina.

2.° Teñido en disolución acuosa concentrada de tionina diluída en un volumen de agua de diez a treinta minutos.

3.° Lavado en agua.

4.° Alcohol al 96 por 100 de uno a tres minutos.

5.° Lavado en agua.

6.° Diferenciación en ácido fosfo-wolfrámico o en glicerina saturada de ácido fosfo-molíbdico de diez a quince minutos.

7.° Lavado en agua corriente de dos horas o más.

8.° Inmersión en disolución de alumbre potásico en agua destilada al 5 por 100 de una a dos horas.

9.° Lavado en agua corriente de tres a doce horas.

10. Alcohol, carbolxilol, bálsamo.

Las fibrillas óseas aparecen incoloras, pero resaltan vivamente sobre la substancia unitiva intensamente teñida en azul.

II. — Piel.

Para el teñido de los cortes de la piel, serán aplicables casi todos los métodos de coloración doble o triple, expuestos anteriormente. Podrán también usarse con provecho los siguientes:

Coloración de la elacina. — En ciertas afecciones cutáneas, en la piel de los viejos y en el estroma del carcinoma, se advierten a menudo fibras elásticas gruesas que atraen las anilinas básicas. Estas fibras alteradas, denomínanse por Unna fibras de *elacina*. Para teñirlas, emplea este autor los procedimientos siguientes:

1.° Los cortes deben permanecer diez minutos en la solución concentrada de azul de metilo policromo (mezcla de azul de metileno, rojo de metileno y violeta de metileno que proporciona la casa Grübler, de Leipzig).

2.° Lavado rápido en agua.

3.° Inmersión por quince a veinte minutos en una solución al 33 por 100 de tanino.

4.° Lavado completo en agua para arrastrar todo resto de precipitado tánico.

5.° Decoloración en alcohol absoluto, aclaramiento en bergamota y montaje en bálsamo.

Las fibras de elacina aparecen de azul obscuro; las de colágena, de azul claro; los núcleos, en parte, azules, en parte, violados, y las células cebadas y la keratina, de violado.

El otro método propuesto es el siguiente:

1.° Los cortes se tiñen de dos a cinco minutos en una solución acuosa al 1 por 100 de azul al agua (Wasserblau).

2.° Lavado en agua e inmersión por tres minutos en una solución acuosa al 1 por 100 de safranina, a la cual se han incorporado algunas gotas de aceite de anilina.

3.° Lavado por algunos segundos en alcohol que contenga algunas gotas de ácido clorhídrico. Deshidratación en alcohol absoluto, bergamota y bálsamo.

Las fibras de elacina se tiñen en rojo, así como los núcleos y los granos de las células cebadas, y los haces conectivos en azul.

Por lo demás, las fibras de elacina se tiñen también perfectamente con nuestro método a la fuchina y picro-índigo, así como el llamado bibásico.

De los métodos de Weigert y Unna para la coloración específica de las fibras elásticas hemos hablado más atrás.

Coloración de las fibras epidérmicas. — Kromayer ha propuesto a este fin el método de Weigert (modificación del de Gram para la coloración de los microbios), el cual tiñe en violado intenso los filamentos de unión de los corpúsculos epidérmicos.

Unna ha modificado el método de la manera siguiente:

1.° Cortes de celoidina sumamente delgados, se sumergen en la solución siguiente:

Violeta de genciana.....	1'5	gramos.
Alumbre.....	10	—
Agua destilada.....	100	—

Donde permanecen una hora.

2.° Previo lavado, se llevarán a una solución al 5 por 100 de yoduro de potasio, adicionado de algunos cristales de yodo.

3.° Después de algunos minutos de permanencia y previo lavado, se colocan los cortes en porta-objetos, se enjugan con papel secante y se decoloran con la mezcla de xilol y anilina (aceite de anilina, 10; xilol, 40), que es al mismo tiempo deshidratante. Cuando la preparación toma un tinte violado claro transparente, se enjuga otra vez, y se cubre con una laminilla untada de bálsamo. Se pueden hacer, antes de la coloración con la genciana, teñidos previos, ya con alcohol carminado de Mayer, ya con la hematoxilina.

También se tiñen admirablemente con el método de Achúcarro, descrito al tratar de la neuroglia.

PARTE TERCERA

TÉCNICA BACTERIOLÓGICA

A) Técnica bacteriológica general.

CAPÍTULO PRIMERO

PROCEDIMIENTOS PARA LA OBSERVACIÓN DE LOS MICROBIOS

Tratándose de seres microscópicos, huelga decir que su observación ha de realizarse siempre por medio del microscopio, pero según se utilice para ponerlos de manifiesto la diferencia de índice de refracción con relación al medio que los soporta, la iluminación en un campo obscuro o el teñido, tendremos otros tantos grupos de procedimientos.

I. — Examen de los microbios sin teñir sobre fondo iluminado

Constituye la manera más sencilla de observarlos, y es imprescindible para el estudio en vivo, por lo que recomendamos a cuantos se dediquen al estudio de la bacteriología, su empleo de un modo sistemático, pues dadas las facilidades que el procedimiento de las coloraciones ofrece, es muy frecuente el que sea relegado a un término muy secundario.

Para verificarlo, se limpia bien un porta-objetos excavado en su centro (fig. 25) y un cubre-objetos que se monta en una pinza de Cornet (fig. 26) o se deposita sobre un trozo de papel chupón; con un pincelito se deposita una ligera capa de vaselina en todo el borde de la excavación del porta; a continuación, si la materia portadora del microbio es líquida, con una aguja de platino flameada se coloca una pequeña gota en el centro del cubre, pero si la materia es densa, se pone en el cubre una

gota de agua, o mejor suero fisiológico, y sobre ella una pequeñísima porción de la substancia a investigar por medio de la aguja de platino; si teníamos cogido con una pinza el cubre, se deposita sobre papel chupón con la gota hacia arriba, y tomando el porta provisto de la vaselina, se le invierte de modo que la cavidad mire hacia abajo y se le coloca sobre el cubre, haciendo

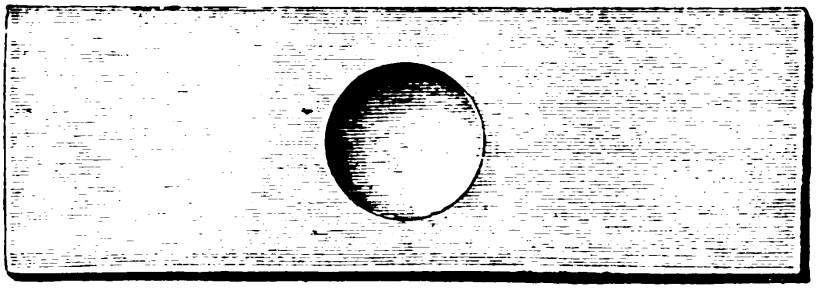


Fig. 25. — Porta-objetos excavado para el examen en vivo.

que la gota ocupe su centro, se ejerce una presión moderada para que la vaselina se extienda entre los dos cristales y el excedente sea embebido por el papel, y levantando el porta que llevará adherido el cubre, se le invierte rápidamente para que éste quede encima.

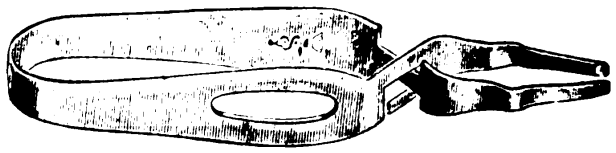


Fig. 26. — Pinza de Cornet.

La observación de la *gota pendiente,* nombre que se da corrientemente en los laboratorios a la preparación que acabamos de hacer, requiere un gran cuidado con la iluminación del microscopio; basada, como hemos indicado, en la diferencia de índice de refracción de los microbios y el medio en que viven, acuosos de escasa concentración en su mayor parte, y siendo estas diferencias, por regla general, mínimas, un exceso de iluminación las borra haciendo invisibles los microbios, siendo preciso en cada caso el determinar la cantidad de luz más favorable para la observación. Para ello se quita el condensador

de Abbe, se ilumina con el espejo plano mirando por el tubo y se cierra mucho el diafragma; se coloca la preparación en la platina, procurando que la gota esté en el eje óptico, y se la sujeta con las pinzas; mirando con un objetivo de poco aumento, el A de Zeiss o el 3 de Reichert, Leitz, etc., se enfoca la gota y se busca su borde; se fija bien la preparación, y sustituyendo el objetivo por otro de mayor poder, amplificante D de Zeiss o 7 de los demás, al mismo tiempo que se mira por el microscopio, se hace descender el tubo por medio de la cremallera hasta que se vea el borde de la gota, y desde este momento se afina el enfoque de los microbios, continuando el descenso con el tornillo micrométrico. Una vez enfocados los microbios, se graduará la cantidad de luz abriendo o cerrando el diafragma hasta que se les vea con el máximo de claridad.

De ordinario, basta el objetivo indicado para la observación de los microbios; pero si se quiere utilizar el objetivo de inmersión, nos cerciorаremos primero de que el cubre es fino, pues en caso contrario nos exponemos a que por ser su espesor casi tan grande como la longitud focal del objetivo, tropiece éste con el cubre antes del enfoque, y al tratar de conseguirlo se rompa el cubre y padezca el objetivo. Una vez convencidos de que el espesor del cubre consiente la observación en inmersión, y después de haber enfocado el borde del gota con el objetivo de poco aumento, se coloca sobre el cubre una gota de aceite de cedro, se hace descender el tubo, hasta que la lente frontal toque al aceite; se levanta ligeramente el tubo sin que se pierda el contacto, y en seguida, mirando por el interior del tubo, se desciende con mucha lentitud, primero con la cremallera y después con el micrométrico, hasta el enfoque perfecto, reglando en este instante la cantidad de luz.

Si al enfocar, con cualquiera de los objetivos indicados, fuera tan escasa la iluminación que no consintiera la operación cómodamente, ábrase más el diafragma, pero téngase en cuenta que conviene practicar el enfoque con defecto de luz, aguardando siempre hasta que esté conseguido para iluminar convenientemente. También debemos indicar que el recurso de buscar el borde de la gota primero con un objetivo de poco aumento y después con el de mayor amplificación, sólo es aplicable cuando los objetivos están bien centrados.

Mediante la gota pendiente, apreciaremos en los microbios la forma, las dimensiones, la presencia de esporos y granulaciones y la movilidad. No siempre es fácil el decidir si el movimiento que se observa en los microbios es activo o molecular; con frecuencia, observando si hay o no traslación en el campo del microscopio o si se trata de un temblor sin traslación, resolveremos la duda; pero en ocasiones, porque se trate de un movimiento activo muy amortiguado o de un movimiento molecular muy activo, el observador se encuentra perplejo; para llegar a formar un juicio exacto, se deberá tener en cuenta que la movilidad de un mismo microbio no es la misma en todas las condiciones; para ello repítanse las observaciones con el germen cultivado en distintos medios y a diferentes temperaturas, háganse las gotas pendientes, valiéndose del caldo de cultivo (nunca del agua destilada, que paraliza el movimiento de las bacterias), y obsérveselas, después de permanecer una hora en la estufa a 37° o a la temperatura óptima, para provocar la aparición de formas juveniles, en general mucho más movibles, y finalmente, utilícese la disolución de sublimado al 1 por 1.000, en la confección de las gotas pendientes, para comprobar si los microbios muertos conservan la misma movilidad. En las de microbios movibles es muy frecuente que éstos se acumulen en el borde de la gota en busca de la región en que la cantidad de oxígeno es mayor a causa del menor espesor.

También se puede verificar el examen sin teñir sobre fondo claro poniendo simplemente una gota del líquido a examinar entre porta y cubre y comprimiendo ligeramente; este procedimiento tiene la ventaja de ser más rápido, si cabe, y facilitar el enfoque para los principiantes; pero como el espacio resulta completamente abierto, el líquido se evapora con rapidez y se originan en el líquido rápidas corrientes que dificultan la observación. Una cosa análoga ocurre en las gotas pendientes, en que la vaselina no cierre perfectamente el espacio de la excavación.

Las gotas pendientes constituyen preparaciones temporales, es decir, que no pueden ser conservadas después de terminadas las observaciones para que fueron hechas; pero al deshacerlas, para aprovechar el porta y el cubre de nuevo no debe

olvidarse que los microbios en ellas contenidos están vivos y constituyen un peligro, que se evitará haciendo resbalar el cubre sobre el porta hasta que sobresalga una de las esquinas, y cogiéndola con unas pinzas se lleva el cubre a un pequeño recipiente de cristal con ácido sulfúrico puro o con alcohol, donde se deja unas horas. El porta se coloca también durante unas horas en otro recipiente con lisol, cresol o algún otro antiséptico. Después de la acción prolongada de los antisépticos, se lavan ambos cristales en agua y se termina su limpieza.

II. — Examen sin teñir sobre fondo obscuro

A pesar de observar las reglas indicadas para la observación de las gotas pendientes con el mayor esmero, resulta imposible o sumamente difícil el llegar a ver algunos gérmenes por su escasa diferencia de índice de refracción con los líquidos acuosos, y entre ellos sobresale el *spirochaete pallida,* agente productor de la sífilis. Para su examen en vivo se hace forzoso el apelar a la iluminación en fondo negro, con los condensadores especiales que construyen todos los fabricantes de microscopios (fig. 27), la mayor parte para colocar en el sitio del condensador ordinario de Abbe, y alguno como el de platina de Reichert que se sujeta sobre la platina del microscopio después de haber separado el condensador ordinario; valiéndose de superficies talladas en parabola o formas derivadas y diafragmas centrales, hacen que todos los rayos que van a iluminar el campo del microscopio caigan sobre la cara superior del cubre con un ángulo mayor que el ángulo limite, y sufriendo una reflexión total, descienden saliendo por la parte inferior o se pierden en la montura; en cambio, los rayos que en su marcha por el espesor de la preparación encuentran algún obstáculo, son dispersados en todas las direcciones, llegando a penetrar en el tubo del microscopio y utilizándose para la formación de la imagen.

Excusado es decir que para aprovechar estas propiedades de tales condensadores, es preciso colocar una gota de aceite de cedro entre el lente superior del condensador y el porta, y que no son utilizables los objetivos de inmersión; pero con los

objetivos apocromáticos a seco de 4 y 3 milímetros de la casa Zeiss, resulta tan perfecta y clara la visión, que no son echados de menos los de inmersión. Ahora bien, las casas que no construyen los apocromáticos a seco, han ideado un dispositivo que permite el empleo de los objetivos de inmersión $^1/_{12}$ empleados corrientemente, que consiste en proporcionar dichos objetivos divisibles en dos mitades que se atornillan, una inferior que contiene el sistema óptico siempre la misma, y otra

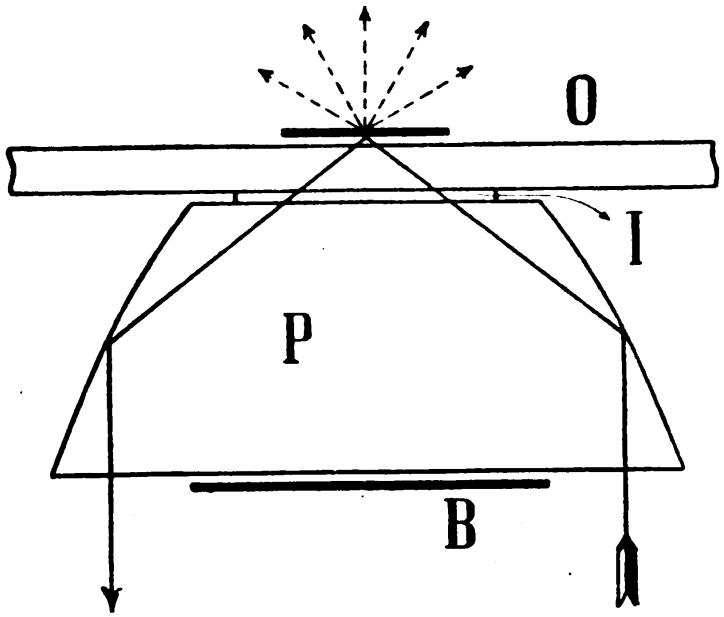


Fig. 27. — Condensador parabólico para la observación en fondo negro.— B, diafragma central; P, condensador; O, porta-objetos; I, gota de aceite de cedro colocada entre el porta y el condensador para formar un medio homogéneo.

superior cambiable que cuando ha de trabajar con fondo claro, es un tubo cilíndrico, y cuando ha de trabajar en fondo negro, lleva en su extremo inferior un diafragma en forma de embudo que retiene los rayos que llegaron al objeto con una abertura grande; de este modo, al poner la gota de aceite de cedro entre el cubre y el objetivo, transformamos el todo en un medio homogéneo, en el que los rayos no experimentan la reflexión total, pero de todos modos, todos ellos llegan al objetivo con un gran ángulo de abertura y se pierden en el diafragma en embudo, no siendo utilizados en la formación de la imagen, que

resulta formada exclusivamente por los que fueron dispersados en los obstáculos encontrados en su camino en el espesor de la preparación.

En estas observaciones no pueden emplearse las gotas pendientes, debiendo estar colocado el objeto entre porta y cubre, ocluyendo todo el borde con una ligera capa de parafina para evitar la evaporación; para esto, después de secar bien los bordes, se enciende una cerilla gruesa como la que emplean los serenos y mejor algo más, y cuando está bien reblandecida se apaga y se la pasa rápidamente por todo el contorno, repitiendo la operación varias veces hasta que la capa sea suficientemente espesa.

Cuando no se pretende observar los microbios vivos se puede hacer el examen en fondo obscuro con gran facilidad y sin necesidad de aparatos especiales, utilizando el proceder indicado por Burri en los cultivos unicelulares. Consiste en colocar una gota de tinta china, que no tenga precipitados, en uno de los lados de un porta, depositar sobre ella una pequeña porción del material a examinar, y después extenderla por medio de otro porta haciendo que toque la gota por su lado menor para que se corra a todo lo largo de dicho borde, y deslizar después un porta sobre el otro, de modo que el cristal vaya por delante de la gota como hemos detallado al ocuparnos de las extensiones de sangre (fig. 23); haciendo el movimiento con regularidad, la capa resulta uniforme y tanto más gruesa cuanto el movimiento es más lento. Se la deja secar y se la observa al microscopio con el objetivo de inmersión; si la capa de tinta tiene el espesor debido, aparecerá el fondo de color pardo, casi negro, en tanto que los microbios dejarán pasar la luz y se mostrarán intensamente iluminados; cuando la capa de tinta sea demasiado espesa, los mismos microbios tendrán tinta encima o debajo, y aunque el fondo aparezca más negro, los microbios resaltarán menos visibles, y si la capa es excesivamente fina, tampoco destacarán los microbios por la gran claridad del fondo. Las preparaciones obtenidas pueden ser conservadas tal como están, con sólo limpiar el aceite de cedro con unas gotas de xilol, pero si se quiere una conservación más perfecta, se pondrá una gota de bálsamo al xilol y un cubre-objetos.

III. — Coloración de los microbios

1.° Consideraciones generales.

Preparación de los colores. — Las bacterias no se coloran por los agentes tintóreos del núcleo o del protoplasma, excepción hecha de las anilinas, que tienen por ellas una àfinidad todavía mayor que por la cromatina.

No todos los colores sacados de la hulla poseen igual valor como reactivos reveladores de bacterias. En general, las tintas básicas de anilina, tales como: el violeta de genciana, la fuchina, el violeta de metilo, el azul de metilo, el pardo de Bismark, etc., tiñen mucho mejor las bacterias que los colores ácidos (fuchina ácida, eosina, etc.).

Las soluciones simplemente acuosas o acuoso-alcohólicas pueden aprovecharse ya para ciertos microbios fáciles de teñir; pero son mucho más eficaces las soluciones del color en agua alcalinizada con la potasa o con aceite de anilina. El agua fenicada es también un menstruo excelente, hoy casi exclusivamente usado para teñir las bacterias de difícil impregnación.

He aquí los colores más usados:

Solución acuosa ordinaria. — En 100 partes de agua se disuelven de 1 a 2 gramos de materia colorante. Si ésta es poco soluble, se hace primeramente la solución en 10 partes de alcohol, adicionando después 90 gramos de agua destilada.

Soluciones acuoso-alcohólicas. — En frascos cerrados con tapón esmerilado se colocan 50 o 100 cent. cúb. de alcohol absoluto y se saturan de la materia colorante respectiva, añadiendo color hasta que no se disuelva más después de agitar frecuentemente el frasco durante varios días. Estas disoluciones alcohólicas se conservan muy bien, y en el momento de utilizarlas se mezclan unos cuantos centímetros cúbicos con cuatro a diez veces su volumen de agua, de modo que la capa de líquido depositada en el cubre, en las coloraciones, resulte casi opaca, no olvidando que, por regla general, las disoluciones acuoso-alcohólicas se alteran pronto.

Líquido de Weigert-Koch. — En 100 partes de agua destilada se

disuelven, por agitación, 5 gramos de aceite de anilina. Se filtra el líquido por un filtro mojado y se adiciona con 11 centímetros cúbicos de solución alcohólica saturada de violeta de genciana y con 10 cent. cúb. de alcohol absoluto o de 96°.

Los colorantes anilinados se alteran más rápidamente todavía que las disoluciones acuoso-alcohólicas, debiendo ser preparados en el momento de utilizarlos; se vierten unas cuantas gotas de aceite de anilina en un tubo de ensayo de modo que se llene la concavidad del fondo y, añadiendo 10 cent. cúb. de agua, se agita fuertemente para facilitar la disolución; se filtra por un filtro mojado para que no pase la más mínima parte del aceite excedente, y se añaden 1 o 2 cent. cúb. de la disolución alcohólica saturada de violeta de genciana, procurando que la capa de líquido extendida sobre el preparado resulte casi opaca y muestre reflejo metálico. De la misma manera se pueden preparar colorantes anilinados con violeta de metilo, fuchina y otros colores.

Líquido de Lœffler:

Solución saturada alcohólica de azul de metileno.....	30	cent. cúb.
— de potasa al 1 por 10.000 ...	100	—

El azul alcalino de Lœffler recién preparado tiñe uniformemente de azul los microbios y todos los elementos anatómicos y tejidos; pero a medida que envejece el azul se torna progresivamente violeta y adquiere una intensa metacromasia, apareciendo de color azul-negro los microbios y las granulaciones de las células cebadas, de color rojo la cromatina y de color rosa o rosa violado la mucina.

Líquido de Ziehl-Neelsen:

Fuchina.....	1	gramo.
Alcohol.....	10	—
Ácido fénico.....	5	—
Agua destilada.....	100	—

Se conserva indefinidamente y lo mismo ocurre con su dilución al décimo, que es corrientemente empleada en bacterio-

logía para las coloraciones comunes de gran número de microbios, vírgula, bacilo de la influenza, etc. Del mismo se preparan soluciones fenicadas de azul de metileno, tionina, violeta de genciana, violeta de metilo, etc.

Decolorantes. — Estos son, según los casos: el agua común, el alcohol, el ácido nítrico al 25 por 100, el ácido clorhídrico al 20 por 100, el ácido sulfúrico al 25 por 100, el aceite de anilina, la esencia de clavo, etc.

Deshidratación y aclaramiento. — La deshidratación, cuando se trate de preparaciones de líquidos en cubre-objetos, se verificará por simple desecación; pero cuando deba realizarse en cortes, se hará en alcohol fuerte o absoluto, conduciendo la operación con gran rapidez para que el color no se disuelva.

El aclaramiento se efectuará con las esencias que no disuelven las anilinas, a saber: la esencia de trementina, la de bergamota, la de orégano, la de cedro y el xilol.

Conservación. — Se efectúa en el bálsamo del Canadá seco y disuelto en xilol a gran concentración. La resina damar disuelta en bencina o xilol es igualmente beneficiosa.

Cuando se tiene interés especial en conservar indefinidamente una preparación de microbios, utilízase el bálsamo seco recién derretido al calor, como se aplica para montar los cortes de hueso. De este modo, quedando los microbios como vitrificados por la perfecta solidez del menstruo, no son de temer las decoloraciones. Así conservamos nosotros, tan bellas como el primer día (hace siete años), preparaciones de cultivos del bacilo vírgula de Koch.

Para los cortes, este método suele retraer los tejidos. En su lugar, nosotros aplicamos el procedimiento de la desecación al aire libre, bajo una delgada capa de bálsamo disuelto en xilol (tal como se practica para el procedimiento de Golgi); más adelante cubrimos los cortes con una laminilla untada de bálsamo seco recién derretido al calor. Las preparaciones quedan de esta suerte vitrificadas e inalterables.

Induración de las piezas para la ejecución de cortes. — El indurante más seguro es el alcohol muy fuerte o absoluto, porque tiene la virtud de conservar incólumes las afinidades tintóreas de los microfitos. También la acetona es un buen indurante.

Para ciertas partes blandas, tales como el pulmón tubercu-

loso, o con lesiones de pulmonía, etc., se echará mano del método de inclusión en goma. Las piezas se fijan primero en el alcohol, luego se dejan dos o tres días en goma siruposa con algunas gotas de ácido fénico; por último, se cuaja la goma en alcohol y se practican los cortes. Excusado es decir que éstos antes de teñirse, deben ser privados de la materia englobante a favor de un lavado completo en agua destilada (y mejor tibia).

El englobamiento en celoidina debe evitarse, pues impide la buena coloración de ciertos microbios. Un tratamiento preliminar de los cortes antes del teñido, con la potasa cáustica al 33 por 100, seguido de un lavado perfecto en agua, quita, por lo menos para muchos microbios, el inconveniente que resulta del encastramiento en celoidina. La parafina puede utilizarse en ciertos casos, porque altera poco las apetencias tintóreas de los mismos. La coloración se verifica sobre el porta-objetos con cortes ya fijados, desparafinados y lavados al alcohol.

2.° Métodos generales del teñido de las bacterias.

Coloración simple. — Constituye el método más general, pudiendo ser aplicado a todos los microbios, empleando en cada caso el colorante más apropiado.

1.° *Extensión.* — Puede verificarse sobre el cubre o el porta, pero por la sencillez de su manejo, nosotros recomendamos el verificar la extensión sobre el porta, ahorrándonos de este modo la necesidad de emplear pinzas, con sólo verificar la extensión en uno de los extremos del porta y utilizar el otro para aplicar los dedos. Los cristales deben estar perfectamente limpios y desengrasados, pues en caso contrario, el agua que sirve de vehículo a los microbios no se deja extender, volviendo a reunirse en gota aun después de largo frotamiento; con los cristales nuevos este inconveniente apenas existe si se emplean para su limpieza paños finos de hilo y limpios (los que no lo están engrasan los cristales) y se tiene cuidado en no tocar la superficie con los dedos, pero con los que ya han sido usados, y si no se quiere encarecer el trabajo, los portas y cubres deben ser empleados en tanto que no queden inservibles por su rotura o el rayado de sus caras, la necesidad de un perfecto desengrasamiento sube de punto. Este se consigue lim-

piando tenazmente con éter y alcohol, cociéndolos media hora en permanganato potásico al 4 por 100, y otra media hora en ácido clorhídrico al 25 por 100, con lavado posterior hasta que el líquido no enrojezca el papel de tornasol, siguiendo las indicaciones de Peppler; cociéndolos repetidamente en una mezcla, a partes iguales, de bicromato potásico y ácido sulfúrico, ambos al 6 por 100, verificada en frío, según van Ermengen y Hinterberger, o sometiéndolos a altas temperaturas, como aconseja Zettnow en su método para el teñido de los flagelos. (Véase más adelante).

Si el material que se ha de extender es muy rico en microbios, conviene hacer una dilución previa, colocando en el porta una gota de agua, depositando en ella una pequeñísima porción del material a examinar, con la aguja de platino flameada, y dejada enfriar y extender después de verificada la mezcla; si no es muy abundante en microbios, pero ofrece consistencia líquida o semilíquida, se extiende una gota del material, sin diluir, y diluyendo en los materiales densos; finalmente, si se trata de una materia sólida, como un trozo de órgano, se frotará fuertemente sobre el cristal o se aplastará entre dos cristales, según aconsejan algunos con las partículas densas de los esputos.

La extensión se verifica tocando la gota que hemos formado sobre el cristal con el asa de platino y haciendo que el líquido se extienda por una superficie proporcionada, a fin de que los elementos resulten convenientemente espaciados y la capa de material no sea tan espesa que dificulte la observación microscópica. Al extender con el hilo de platino cuidaremos de que los movimientos no sean bruscos ni la presión grande para que los elementos y hasta los microbios no resulten destrozados, sobre todo en sus agrupaciones. El hilo de platino no debe pasar dos veces por el mismo sitio, sobre todo desde que la capa primeramente depositada ha sufrido una semidesecación.

2.° *Desecación.* — Se verificará por evaporación a la temperatura ordinaria. Se puede acelerar imprimiendo rápidos movimientos de vaivén al porta o pasándole a bastante distancia de un mechero para utilizar el aire seco y moderadamente caliente. No debe olvidarse que si se pasa por la llama la preparación antes de que esté perfectamente seca, la evaporación

rápida determina la producción de vacuolas y la deformación de los microbios.

3.° *Fijación.* — Por el calor, pasando el porta por la llama de un mechero de alcohol tres o cuatro veces. Si el mechero es de gas se pasará con mayor rapidez.

4.° *Coloración.* — Se vierten sobre la mancha del porta unas cuantas gotas de la solución tintórea (violeta de genciana, fuchina, azul de metileno, etc.), de modo que quede bien cubierta, y se hace actuar durante algunos minutos, en relación con la actividad de la solución que se emplea; así, por ejemplo, con el violeta de genciana y la fuchina bastarán uno o dos minutos; pero si se trata del azul de metileno de Lœffler recién preparado, será conveniente llegar a los cinco o diez minutos. En general es preferible el utilizar colores algo diluídos, como la fuchina al décimo, porque de este modo se evita la producción de precipitados y calentar suavemente hasta la formación de vapores para hacer el teñido más intenso y rápido.

5.° *Lavado.* — Tiene por objeto quitar el color excedente y se realiza abundantemente con agua de la fuente.

6.° *Desecación.* — Espontánea o a un calor suave, después de quitar una gran parte del agua entre dos hojas de papel chupón.

7.° *Observación al microscopio.* — Una vez seca se deposita sobre la mancha teñida una gota de aceite de cedro, haciendo descender el tubo del microscopio hasta que el objetivo de inmersión se ponga en contacto con el aceite, enfocando a continuación mirando por el tubo. Después de terminada la observación, para conservar la preparación, basta verter algunas gotas de xilol sobre el porta para que arrastre el aceite; pero si se quiere proteger con un cubre, se hace el montaje con bálsamo al xilol, según se dijo antes. Las preparaciones sin cubre no pueden ser observadas con los objetivos a seco.

Cuando no queramos conservar la preparación se coloca en un recipiente con cresol al 5 por 100, y mejor lisol, muy concentrado al tercio o al cuarto, y después de varias horas de acción se limpian, según dijimos al principio.

Método de Lœffler. — Proporciona excelentes resultados, señaladamente en la coloración de las bacterias en cortes. Posee especial predilección por el bacilo de la difteria, el del muermo, etc.

1.° Los cortes, extraídos del alcohol, se someten, durante tres a veinte minutos, a la acción de un líquido compuesto de

Azul de metileno disuelto a saturación en alcohol	30 gramos.
Lejía de potasa (al 0'01 por 100).....	100 —

También se pueden emplear fuchina anilinada o fenicada.

2.° Inmersión por diez a treinta segundos en

Ácido acético..... 0'5 o	1 gramo.
Agua destilada..... 100	—

3.° Decoloración en alcohol.

4.° Aclaramiento en xilol. Bálsamo.

Método de Kühne. — Es aplicable aun a las bacterias de más difícil impregnación, y particularmente a los cortes.

1.° Llévanse los cortes desde el alcohol a la solución siguiente, donde permanecerán de media a dos horas:

Azul de metileno.....	1'5 gramos.
Alcohol absoluto..... 10	—
Agua fenicada al 5 por 100..... 100	—

2.° Rápido lavado en agua común.

3.° Transporte de los cortes a un primer líquido decolorante, compuesto de: agua, 100; ácido clorhídrico, 2 gotas, donde quedarán hasta que aquéllos tomen una tinta azul muy clara.

4.° Inmersión, por algunos minutos, en una solución de carbonato de litina (6 u 8 gotas de solución saturada de carbonato en 10 de agua).

5.° Lavado, por tres a cinco minutos, en agua.

6.° Acción sobre los cortes, y por espacio de algunos segundos, del alcohol absoluto.

7.° Transporte de los mismos a una solución concentrada de azul de metileno en aceite de anilina.

8.° Decoloración prolongada en aceite de anilina, que se cambiará varias veces.

9.° Aclaramiento en esencia de trementina: bálsamo.

El método de Kühne ha sido simplificado por Pregl (1892). Este autor comienza por incluir las piezas cuyos cortes han de colorearse en la parafina, fijando las secciones al porta-objetos con albúmina glicerinada. Después procede a la tinción, según la marcha siguiente:

1.° Los cortes, pegados al porta o cubre objetos, desparafinados y lavados con agua, son teñidos, por medio a un minuto, en la solución fenicada de azul de metileno (solución de Kühne). A veces conviene el empleo del calor.

2.° Lavado ligero en agua.

3.° Diferenciación en alcohol al 50 por 100, hasta que los cortes aparezcan de matiz gris azulado.

4.° Deshidratación en alcohol absoluto.

5.° Aclaramiento en xilol.

6.° Inclusión en resina o bálsamo.

Este procedimiento tiñe, como el de Kühne, la mayor parte de los microbios, teniendo la ventaja de poderse operar con gran rapidez.

Método de Nicolle al tanino. — 1.° Coloración con azul de metileno, alcalino o fenicado, de cinco a treinta minutos.

2.° Lavado de unos segundos en agua sola o con ácido acético al $^1/_2$ o 1 por 100.

3.° Acción durante unos segundos de una disolución de tanino al 10 por 100, aunque ya es utilizable una disolución al 1 por 100. En este líquido el azul de metileno se torna insoluble y no se pierde en la deshidratación posterior con el alcohol.

4.° Lavado en agua, deshidratación, xilol y bálsamo.

Este procedimiento es muy recomendable para las bacterias que se decoloran con facilidad, como las de la fiebre tifoidea, peste, etc., pudiendo utilizarse también para la fijación del azul de metileno, haciéndolo insoluble, el molibdato amónico, según hemos indicado al describir el método de Ehrlich en la técnica especial del sistema nervioso.

Método de Nicolle a la tionina. — 1.° Teñido en tionina fenicada de medio a dos minutos.

2.° Lavado en agua.

3.° Deshidratación y diferenciación simultánea en el alcohol, debiendo verificarse esta operación con rapidez y precaución, para que las bacterias no se decoloren por completo.

4.° Xilol, bálsamo.

De la misma manera se puede verificar la coloración con la disolución acuosa de violeta de genciana, de quince a treinta minutos, y diferenciar en alcohol al 50 por 100, deshidratando después en alcohol absoluto, y en seguida xilol y bálsamo. Pfeiffer teñía quince a treinta minutos en fuchina fenicada diluída, y después diferenciaba en alcohol con unas gotas de ácido acético.

3.° Método de Gram y sus modificaciones.

Método de Gram. — Consiste en teñir los microbios por el violeta de genciana, el violeta de metilo, el azul Victoria o algún otro color del grupo de la pararosanilina y hacer actuar a continuación una disolución acuosa de yodo con yoduro potásico; en estas condiciones ciertas bacterias muestran tal afinidad por el color, que, aunque se sometan a la acción del alcohol, no se decoloran, en tanto que otras bacterias y los elementos de los tejidos se decoloran por completo. Entre las que se tiñen, llamadas Gram-positivas, están los estafilococos, estreptococos, pneumococo, casi todos los bacilos aerobios esporulados y algunos de los anaerobios, del carbunco, del tétanos, y entre los no esporulados, los de la tuberculosis y difteria y sus semejantes; en cambio, resultan decoloradas entre los cocos el gonococo, el meningococo y la mayor parte de sus similares, el de la fiebre de Malta, casi todos los bacilos aerobios no esporulados, grupo del coli-tifus, grupo de la septicemia hemorrágica con el de la peste humana, grupo de los hemoglobinófilos con el de la influenza, grupo del aerogenes capsulatus con el pneumobacilo de Friedländer, el del ozena y el del rinoescleroma y, finalmente, el del muermo y los espirilos.

Una no despreciable ventaja dél método de Gram es la perfecta decoloración de las células, lo que se presta a teñidos complementarios ulteriores, tanto del fondo general como de los núcleos.

Marcha de las operaciones:

1.ª Extensión en cubre-objetos, desecación y fijación a la llama, según el procedimiento anterior, del líquido sospechoso.

2.ª Acción, durante cuatro a diez minutos, de una solución

saturada de violeta de genciana en agua, también saturada de aceite de anilina, del modo descrito (pág. 205).

3.ª Inmersión del cubre-objetos, por medio a dos minutos, sin lavado intermedio, en este líquido:

Yodo	1 gramo.
Yoduro de potasio	2 —

Disuélvase en 5 cent. cúb. de agua y complétese hasta 300.

Aquí adquiere el preparado color pardo o negro.

4.ª Decoloración en alcohol, que se mudará varias veces, hasta que el alcohol no salga teñido.

5.ª Como coloración contraste, es decir, para teñir los elementos de los tejidos y los microbios Gram-negativos, empléanse las disoluciones acuoso-alcohólicas de vesubina, safranina y fuchina. Nosotros recomendamos el empleo de la fuchina fenicada diluída al décimo, pues con sólo unos segundos de acción, se obtiene una coloración rosa que contrasta grandemente con la intensamente violeta de los microbios Gram positivos.

6.ª Lavado rápido en agua y desecación espontánea. También se pueden emplear para el método de Gram las disoluciones fenicadas, que se conservan indefinidamente. Para acelerar la decoloración Günther, aconsejaba el empleo del alcohol clorhídrico al 3 por 100 durante diez segundos y después el alcohol absoluto, y Nicolle el alcohol con un tercio de acetona.

Puede prescindirse, en muchos casos, de la coloración de contraste. En general, todo color de fondo debilita algo la impregnación de los microbios, por lo cual, de utilizarlo, es preciso cuidar que la decoloración primera en el alcohol no sea excesiva.

El método de Gram produce algunas veces finos precipitados de color en el fondo y las células, que los principiantes toman a menudo por micrococos.

La diversidad de forma y tamaño de estas granulaciones y su disposición irregular, las distinguen fácilmente de los microbios. Por lo demás, tales precipitados desaparecen mediante suficiente decoloración en alcohol.

El método de Gram puede utilizarse también para los cor-

tes; solamente que la coloración deberá ser algo más larga (quince minutos a una hora) y actuar más tiempo también el alcohol. La deshidratación se hará, no por desecación, sino mediante el alcohol fuerte. En cuanto al aclaramiento, se efectuará en la esencia de bergamota, de trementina o xilol. La coloración contraste puede hacerse con picro-carmín, fuchina, safranina, vesubina, etc.

Proceder de Claudius.—En muchos casos este proceder general de coloración resulta más cómodo y preciso que el de Gram, pues no se corre el riesgo de decolorar excesivamente.

1.° Coloración, durante un minuto, en violeta de genciana fenicado o en *cristal violet* fenicado, esto es:

Cristal violado.....	1 gramo.
Acido fénico.....	2 —
Alcohol absoluto.....	10 cent. cúb.
Agua.....	100 —

2.° Lavado en agua.

3.° Acción durante un minuto de una solución saturada de ácido pícrico.

4.° Enjugar el exceso con papel de filtro.

5.° Decolorar en cloroformo o esencia de clavos.

6.° Montaje en damar o bálsamo.

Método de Weigert.—Es una modificación del de Gram, al cual lleva la ventaja de no producir precipitados de color y no ser ocasionado tan fácilmente a decoloraciones excesivas.

Por lo demás, el método de Weigert impregna casi todos los microbios, particularmente en los cortes. Tiñe también con gran precisión los hilos de fibrina.

Conviene generalmente combinar el método de Weigert con el del litio-carmín, a fin de colorar el fondo y los núcleos de una tinta de contraste.

1.° Coloración de los cortes por el litio-carmín, según el método ordinario utilizado en las neoplasias.

2.° Después de tratados por el clorhidrato de alcohol se lavan perfectamente en agua, a fin de arrastrar todo resto del ácido.

3.° Transporte de los cortes a una solución saturada de vio-

leta de genciana en agua de anilina, en donde permanecerán de cinco a quince minutos.

4.° Lavado rápido en agua salada (sal común, 0'6; agua, 100).

5.° Transporte de los cortes a un porta objetos, donde se extenderán y se privarán del exceso de humedad, mediante papel chupón.

6.° Acción por uno o dos minutos de la solución yodo yodurada (como en el método de Gram).

7.° Absorción del líquido con papel secante.

8.° Decoloración con aceite de anilina (nada de alcohol), que se mudará varias veces, hasta que no extraiga color. Para evitar decoloraciones excesivas, se aconseja un líquido compuesto de: xilol, 2; aceite de anilina, 1.

9.° Aclaramiento y extracción del aceite con xilol y montaje en bálsamo.

4.° Teñido de las cápsulas.

Las cápsulas de los microbios se ponen de manifiesto con todos los colorantes que tiñen la mucina, por sus propiedades metacromáticas, es decir, con las disoluciones enrojecidas de azul de metileno, las disoluciones de azur de metileno, de tionina, de violeta de Lauth, de violeta de genciana y formalina, de safranina y con el mucicarmín y la mucihematoxilina. Basta verificar una intensa coloración con cualquiera de estos colorantes y después un lavado rápido en agua, desecando con rapidez con papel chupón el agua, pues arrebata rápidamente el color rosado de la cápsula, para verlas bien teñidas.

En las coloraciones con substancias que no sean capaces de teñir las cápsulas, éstas aparecen como aureolas incoloras en torno de los microbios; pero como con frecuencia los microbios pueden aparecer en las preparaciones rodeados de dichas aureolas coloreadas, aunque no tengan cápsulas, será conveniente no afirmar su existencia en tanto no se las tiña directamente.

La fijación preferible para el teñido de las cápsulas es la que se obtiene sometiendo las extensiones a los vapores de ácido ósmico.

Método de Johne. — 1.° Coloración con la disolución acuosa de

violeta de genciana al 2 por 100, calentando de uno a dos minutos.

2.° Lavado en agua.

3.° Decoloración en ácido acético al 1 o 2 por 100, de seis a diez segundos.

4.° Lavado en agua y observación en este líquido, pues el aceite aclara demasiado las cápsulas, haciéndolas invisibles.

Nicolle tiñe unos segundos con la disolución fenicada de violeta de genciana y, después de lavar, decolora con la mezcla de dos partes de alcohol y una de acetona.

Método de Ribbert. — 1.° Coloración durante unos segundos en una disolución de Dalia a saturación en caliente, en una mezcla de 100 partes de agua destilada, 50 de alcohol absoluto y 12'5 de ácido acético glacial.

2.° Lavado y observación en el agua.

Método de Räbiger. — Consiste en teñir durante veinte minutos, sin fijación previa, en una disolución de violeta de genciana en formalina a saturación en frío, filtrada después de varias horas de contacto; ligero lavado y observación en agua o en aceite, previa desecación.

Método de Weidenreich-Hamm. — Extensión del material mezclado con una gota de suero. Fijación con ácido ósmico al 1 por 100, de treinta a cuarenta segundos. Coloración con el líquido de Giemsa.

5.° Coloración de los esporos.

El principio de la coloración de los esporos es el mismo que ha servido para idear la impregnación de los microbios difícilmente coloreables, a saber: los ácidos minerales decoloran difícilmente todo microbio o parte de microbio, reacio en teñirse. En efecto, con los métodos comunes antes descritos, el protoplasma bacteriano se impregna luego, mas no el de los esporos, que resiste mucho tiempo, resaltando por claro sobre el fondo protoplásmico coloreado. Pero una vez lograda la impregnación de los gérmenes, no abandonan tan fácilmente como el cuerpo bacteriano la tinta adquirida bajo la solicitación de los ácidos minerales o del alcohol fuerte, lo que permite una coloración subsiguiente de contraste de todo lo desteñido. De

todos modos, la decoloración de los esporos es mucho más rápida que la de los bacilos ácido-resistentes, debiendo por esta razón ser muy cuidadosa.

Uno de los procedimientos más seguros es el siguiente:

1.° Extensión, desecación y fijación en la llama de la substancia bacteriana.

2.° Coloración, durante treinta o cuarenta minutos, en solución caliente de fuchina fenicada.

3.° Decoloración, durante un minuto, en ácido nítrico al 5 por 100.

4.° Lavado rápido en agua.

5.° Coloración, por dos minutos, en el azul de Lœffler.

6.° Nuevo lavado rápido en agua.

7.° Desecación espontánea y bálsamo.

Un método más reciente (1891) y también eficaz, según nuestros ensayos, es el siguiente:

Método de Moeller. — 1.° Extensión y desecación espontánea del cultivo en un cubre-objetos, después de lo cual se pasa tres veces a la llama de alcohol.

2.° Lavado por dos minutos en cloroformo.

3.° Lavado rápido en agua.

4.° Inmersión, por medio a un minuto, en ácido crómico al 5 por 100.

5.° Lavado en agua abundante.

6.° Coloración, por un minuto, en un baño de fuchina fenicada (fórmula ordinaria) calentada a la lámpara.

7.° Arrojado el exceso de color, se destiñe mediante una solución al 5 por 100 de ácido sulfúrico.

8.° Lavado en agua.

9.° Teñido, por treinta segundos, en una solución acuosa concentrada de verde malaquita o azul de metileno.

10. Nuevo lavado. Desecación espontánea y bálsamo.

Este método tiñe los esporos en rojo y el protoplasma en azul o verde. El lavado por el cloroformo parece facilitar, mediante la disolución de las grasas, lecitina, colesterina, etc., la penetración del color en los esporos.

Método de A. Klein (1899). — 1.° Se mezcla la cultura en caldo con solución fisiológica de sal común.

2.° La mezcla obtenida se adiciona, a partes iguales, con la

solución de fuchina fenicada de Ziehl, y se calienta el todo por seis u ocho minutos hasta producir vapores.

3.° Se toma un poco del líquido y se deja secar en porta-objetos, fijando con la llama de la lámpara.

4.° Decoloración, por dos o tres segundos, en ácido sulfúrico al 1 por 100.

5.° Lavado en agua.

6.° Coloración subsiguiente, en una solución acuoso-alcohólica de azul de metileno, por tres o cuatro minutos.

Los bacilos aparecen de color azul; los esporos, rojos.

Actualmente recomendamos emplear los cinco primeros tiempos del método de Moeller, teñir de media a varias horas en fuchina fenicada en estufa y decolorar con alcohol y agua a partes iguales, observando al microscopio hasta que los microbios aparecen de color rosa muy pálido. Lavado y coloración de fondo con azul de metileno o de Lœffler diluído.

6.° Coloración de los flagelos.

Koch y Neuhaus habían observado ya en negativas fotográficas, tomadas de ciertos microbios movibles, la existencia de pestañas, que no era posible descubrir en la observación microscópica ordinaria, por cuanto ninguno de los métodos utilizado para el teñido de los microbios las impregnan. No obstante, Koch logró ya revelarlas, tratando las preparaciones con el extracto de palo de campeche; y Neuhaus obtuvo resultados mejores utilizando la tinta negra de escribir y un tratamiento subsiguiente con una solución caliente de cromato neutro de sodio.

En la actualidad, los procedimientos empleados para el teñido de los flagelos son numerosísimos, por lo que nos limitaremos a la descripción de los principales, después de hacer unas indicaciones aplicables a todos ellos. Estas son: 1.° Comprobar si el microbio al que tratamos de teñirle los flagelos goza de plena movilidad, por medio de la observación en vivo en la gota pendiente, pues aun empleando cultivos jóvenes, como no posean la movilidad más acentuada de que cada especie sea capaz, nos exponemos a que la mayor parte de los individuos hayan perdido los flagelos total o parcialmente. 2.° Utilizar

cultivos en medios sólidos, agar con preferencia, pues los cultivos líquidos suelen producir muchos precipitados. 3.° Emplear diluciones muy grandes para evitar igualmente los precipitados y para que estando convenientemente espaciados los microbios, no se enreden sus flagelos y se desprendan con más facilidad; para ello se colocan en un porta dos gotas de agua, con el asa de platino se pone una pequeñísima porción del cultivo en la primera, y después de esperar unos minutos para que el microbio se reparta por toda la gota con uniformidad, se toca con el asa flameada y fría la primera gota, de modo que el líquido ocupe el espacio y se lleva a la segunda gota, de la que se parte para hacer las extensiones. 4.° Evitar en todas las operaciones la producción de corrientes enérgicas en los líquidos para que no se desprendan los flagelos; a este fin, al hacer la disolución descrita, no agitaremos para hacer homogénea la disolución, sino que aguardaremos a que el mismo microbio se reparta en virtud de sus propios movimientos, y al verificar la extensión sobre los cubres, pondremos una pequeña gota en el centro, que se extenderá con gran lentitud, describiendo con el hilo de platino círculos cada vez más amplios a partir de la gota, y caso de microbios muy deleznables, será ventajoso dejarla sin extender. 5.° Una perfecta extensión del material sobre el cubre, solamente puede obtenerse si está por completo desengrasado, en cuyo caso el líquido se extiende casi espontáneamente; esto se consigue poniendo sobre la platina de Malassez o una chapa de hierro que se calienta intensamente con un mechero de gas o de alcohol, los cubres que se van a utilizar, después de limpiados con un paño, y recogiéndolos, después de diez o quince minutos de acción, con las mismas pinzas, es decir, sin que los toquen los dedos para nada. 6.° Si por la índole especial del método empleado no está contraindicada, aconsejamos hacer la fijación de los microbios antes de extenderlos, empleando, según es corriente en los laboratorios, el ácido ósmico, bien sometiendo las gotas hechas para la dilución a la acción de los vapores, o lo que es preferible, colocando al lado de la segunda gota otra de la disolución de ácido ósmico al 2 por 100, y después de verificada la dilución en aquélla, unirlas por medio del hilo de platino, con suavidad.

Método de Loeffler. — 1.° Dilución, fijación y extensión, según

acabamos de indicar. Desecación espontánea. Paso por la llama varias veces.

2.° Acción durante medio a un minuto, calentando hasta la emisión de vapores del mordiente formado de

Tanino al 20 por 100.....	10 gramos.
Sulfato ferroso a saturación en frío....	5 —
Solución acuosa saturada en frío de fuchina.....	1 —

Esta fórmula, apropiada según Lœffler para el *Spirillum concentricum,* debe ser corregida para los demás microbios añadiendo pequeñas cantidades de ácido nítrico o sosa, según el microbio de que se trate, con arreglo a una pauta, creyendo nosotros preferible el empleo del mordiente sin modificación, según aconsejan Nicolle y Morax, renovando el mordiente tres veces, diez segundos cada vez, y calentando hasta la emisión de vapores, lavando entre cada dos aplicaciones.

3.° Lavado a un chorro fuerte para arrastrar todos los precipitados formados por el mordiente, sobre todo en los bordes.

4.° Acción rápida del alcohol hasta decolorar todas aquellas partes del cubre en que no hay microbios.

5.° Coloración calentando durante algunos minutos con

Solución saturada de fuchina en agua de anilina.....	100 gramos.
Solución de sosa cáustica al 1 por 100..	1 —

Si al añadir la sosa la materia colorante queda completamente transparente, debe añadirse más, gota a gota, hasta que comience a enturbiarse.

6.° Lavado en agua y desecación.

La *modificación de Nicolle y Morax* al método de Lœffler consiste en lo dicho respecto al mordiente, en prescindir del alcohol después del mordiente y en el empleo como colorante de la fuchina fenicada de Ziehl.

La *modificación de Bunge* consiste en:

1.° Tinción con

Disolución acuosa saturada de tanino....	3 partes.
Percloruro de hierro al 20 por 100.....	1 —

A cada 10 cent. cúb. de esta mezcla añádanse 2 cent. cúb. de la disolución acuosa saturada de fuchina y téngasele en reposo unos días.

2.° Lavado en agua. Desecación entre papel chupón.

3.° Coloración al calor suave con violeta de genciana fenicada.

4.° Ácido acético al 1 por 100 medio a un minuto.

5.° Lavado en agua y desecación.

Se puede acelerar la transformación del mordiente para utilizarlo poco después de hecho, añadiendo agua oxigenada a gotas hasta que el color rojo se vuelva pardo.

Método de Van Ermengen. — 1.° La laminilla, con la dilución de bacterias, se coloca durante cinco minutos a 50° o media hora en frío en este mordiente:

Solución de ácido ósmico al 2 por 100...	8 gramos.
— acuosa de tanino al 10 o 20 por 100.....	16 —
Ácido acético.....	1 gota.

2.° Lavado en agua y después en alcohol absoluto.

3.° El preparado se trata durante dos minutos por esta solución:

Nitrato de plata.....	1 gramo.
Agua destilada.....	200 —

4.° Reducción del preparado durante un minuto en este líquido:

Ácido gállico.....	5 gramos.
Tanino.....	3 —
Acetato de sosa fundido.....	10 —
Agua.....	350 —

5.° Inmersión de la preparación en el baño de plata antes citado hasta que se obtenga una tinta negra fuerte.

6.° Lavado, desecación, montura, etc.

Este método es menos inconstante que los precedentes, te-

niendo sólo el inconveniente de dar precipitados granulosos que ensucian el fondo. Para descartar estos precipitados, posteriormente (1909), Hinterberger ha modificado la manera de operar de Van Ermengen de este modo: En vez de la solución acuosa de nitrato de plata usa un soluto alcohólico al 1 por 100, y para quitar el exceso de nitrato sumerge el preparado en una solución de sal al 2 por 100 y últimamente en amoníaco al 30 por 100. La solución amoniacal del cloruro de plata es eliminada por un lavado con alcohol de 95°. En suma, estos tres tratamientos sustituyen a la operación tercera de la fórmula de Van Ermengen. Si se obtiene una tinta demasiado pálida, debe repetirse la serie de tratamientos.

Método de Welcke (1899). — 1.° Las bacterias, que deben provenir de una cultura en agar de menos de veinticuatro horas, se diluyen en agua común.

2.° Una parte de este líquido se transporta a un porta-objetos, donde se extiende con una aguja de platino. La desecación debe ser espontánea.

3.° El preparado se fija pasándolo tres o cuatro veces por la llama.

4.° Durante veinte minutos se pone en contacto con el mordiente (en frío) de Lœffler o de Bunge, pero diluído a la cuarta parte o más.

5.° Escurrido el líquido, sométese la preparación a la acción de una solución de óxido de plata amoniacal, que se calienta hasta producir vapores.

6.° Lavado por un cuarto de minuto en una solución de $HgCl^2$ al 1 por 100.

7.° Lavado rápido en agua.

8.° Acción por un cuarto de minuto de un revelador: rodinal, mentol, etc. Lavado y desecación.

En las preparaciones difíciles de teñir debe repetirse, después de la operación séptima, el tratamiento con el óxido de plata amoniacal.

Método de Zettnow. — 1.° Preparación de las extensiones con estrecha sujeción a los principios generales antes indicados, es decir, sobre cubres desengrasados por el calor, después de haber hecho la dilución en un porta por medio de las dos gotas y haber mezclado la última con otra de ácido ósmico al 2 por 100

y cuidando en todo momento de no agitar los líquidos ni extender de una manera grosera para que no se desprendan los flagelos.

2.º Fijación a la llama.

3.º Acción del mordiente. Este se prepara con las dos disoluciones siguientes:

I. Tanino.....	10 gramos.
Agua.....	200 cent. cúb.
II. Tártaro estibiado.....	2 gramos.
Agua.....	40 cent. cúb.

Póngase la primera a unos 50 o 60°, añádanse 36 cent. cúb. de la segunda y caliéntense hasta la ebullición para que se redisuelva el precipitado, dejándola enfriar en cuanto esto se consigue. Si al calentar no se consigue la redisolución, hay que agregar algunos centímetros cúbicos de la disolución de tanino hasta que se consiga, y si por el contrario la mezcla no se vuelve opaca al enfriarse tomando un aspecto lechoso, añádanse algunos centímetros cúbicos de la disolución de tártaro estibiado. Estos tanteos deben verificarse con unos cuantos centímetros cúbicos de la mezcla puestos en un tubo de ensayo y teniendo cuenta de las cantidades añadidas, calcularemos fácilmente lo que tenemos que añadir al total de la mezcla; son imprescindibles, pues siendo muy desiguales las distintas suertes de tanino proporcionadas por los distintos fabricantes y aun por el mismo, no pueden aplicarse a los unos los resultados obtenidos con los otros. Los datos proporcionados por Zettnow refiérense al tanino de J. D. Riedel, de Berlín. Una vez terminada la mezcla, añádanse algunos cristales de timol para evitar el desarrollo de hongos.

Para hacer actuar el mordiente, se coloca el cubre invertido, es decir, con la cara en que hemos hecho la extensión hacia abajo, en un pocillo de cristal de los corrientemente usados en histología; en un tubo de ensayo se calientan, hasta la ebullición, unos cuantos centímetros cúbicos del mordiente, para que se ponga transparente por completo, y en este momento se vierte en el pocillo; se deja que actúe algunos minutos, y

cuando comienza a enturbiarse, sujetando con un dedo el cubre, se vierte el mordiente y se hace que en la cavidad del pocillo caiga durante un gran rato un chorro de agua bastante fuerte; después se vuelve a coger el cubre, sujetándolo por una de sus esquinas con una pinza Cornet, sin olvidar que estaba invertido para darle la vuelta de modo que la extensión quede hacia arriba, y se continúa el lavado algún tiempo más sobre la cara extendida.

4.° Coloración con la disolución de plata en etilamina. Se obtiene, en primer término, el sulfato de plata mezclando

Nitrato de plata.....	5 gramos.
Agua destilada.....	30 cent. cúb.
Sulfato sódico.....	6 gramos.

Cuando todo el precipitado se ha depositado, se lava varias veces con unos 20 cent. cúb. de agua destilada, agitando y dejando depositar de nuevo. Después del último lavado, el depósito, que viene a representar unos 4 gramos, se coloca en un frasco con 500 cent. cúb. de agua destilada y se agita repetidamente durante varias horas, dejando más tarde que se deposite el exceso y se aclare el líquido. También se puede emplear el sulfato de plata, que distintos fabricantes proporcionan preparando disoluciones saturadas.

Unos cuantos centímetros cúbicos de la disolución saturada de sulfato de plata se colocan en un tubo de ensayo y se mezcla con un volumen igual de agua destilada; en seguida se añade gota a gota etilamina comercial (33 por 100), formándose primero un precipitado que se redisuelve después, debiéndose emplear solamente la cantidad precisa de etilamina para que se obtengan buenos resultados. Por esta razón nosotros empleamos la etilamina comercial diluída al décimo, y es conveniente saturar el pequeño exceso de etilamina añadiendo algunas gotas de la disolución de sulfato de plata hasta que el precipitado que se forma se redisuelva con dificultad.

También se puede emplear el amoníaco en lugar de la etilamina, pero el precipitado de plata que se obtiene en las coloraciones es más grosero y las preparaciones resultan menos bellas.

Una vez preparado el colorante, se vierten unas gotas sobre el cubre, procurando que queden depositadas en él y no se escapen, se calienta el cubre hasta la producción de vapores y se continúa la acción hasta que se señale la parte del cubre donde se verificó la extensión. Entonces se lava, dejando caer un chorro fuerte sobre el cubre para que arrastre los depósitos de plata y se observa la preparación al microscopio, poniendo el cubre sobre el porta y una gota de agua intermedia; si los flagelos están bien teñidos se vuelve a lavar bien la preparación, se deseca y se monta con aceite de cedro para la observación; si resultan pálidos, se puede volver a repetir la coloración hasta que tomen la intensidad debida, y si no están coloreados de ningún modo debe repetirse la preparación eliminando las causas que motivaron el fracaso.

Los microbios aparecen intensamente negros, los flagelos negros con intensidad proporcionada a su masa y el fondo claro y sin precipitados; si éstos se presentan, puede ser debido al exceso de material o al deficiente lavado después del mordiente o del colorante. Si son cristales, se deben a la concentración de la plata por el calentamiento prolongado.

Cuando se quiere teñir flagelos difícilmente visibles por su tenuidad, aconseja reforzar el teñido por medio de un dorado del siguiente modo: se vierten en la preparación unas cuantas gotas de la disolución de cloruro de oro neutro al 1 por 2.000; después de algunos minutos de acción, se lava y se substituyen por cuatro gotas de una disolución de soda cristalizada al 2 por 100, recientemente preparada, y una o dos gotas de

Acido pirogálico.....	1 gramo.
Alcohol.....	20 cent. cúb.
Acido acético.....	11 gotas.

procurando que mezclen bien por ligeros movimientos del cubre y calentando a continuación suavemente durante un minuto.

Si al observar al microscopio la coloración fuera débil, todavía puede repetirse el refuerzo.

Las preparaciones bien teñidas que hayan de ser conservadas de un modo permanente, se montarán, después de bien se-

cas, en bálsamo perfectamente neutro y mejor en bálsamo seco, pues de lo contrario palidecen con rapidez. El montaje en bálsamo seco se hace poniendo sobre un porta una gota de bálsamo disuelto en su aceite esencial con consistencia de jarabe espeso, se calienta con suavidad a distancia de un mechero, para que se evapore el aceite esencial y no se inflame (si ocurre esto, el daño no es grande porque se apaga con facilidad, pero el bálsamo se tiñe de amarillo); cuando la evaporación es suficiente para que el bálsamo se vuelva sólido al enfriarse, según está caliente, se coloca el cubre invertido, se oprime para expulsar el bálsamo excedente y se enfría con rapidez, con lo que se transformará en una masa sólida incapaz de actuar sobre el teñido. Conviene no quitar por completo el aceite esencial, porque en este caso al enfriarse, se transforma en una masa frágil que se resquebraja con facilidad y se desprende al menor choque.

Método de Casares (1912). — El colorante se prepara disolviendo cuidadosamente en un mortero, en 30 cent. cúb. de alcohol de 70°, 10 gramos de tanino y 18 gramos de cloruro de aluminio hidratado. Después se añade gota a gota una disolución de 10 gramos de cloruro de cinc en 10 gramos de agua y 1'5 gramos de clorhidrato de rosanilina.

Esta disolución madre se coloca en un frasco, sin filtrar.

Para colorear las preparaciones, se mezcla de una vez, una parte de la disolución anterior con cuatro partes de agua destilada, se agita, se deja reposar un minuto y se filtra. Del líquido que filtra se depositan unas gotas sobre la extensión dejándolas actuar hasta que se forme en la superficie una capa de reflejo metálico (aproximadamente un minuto). Se lava a chorro fuerte para eliminar los precipitados, apareciendo ya los flagelos teñidos; para teñir el cuerpo de los microbios, se da una segunda coloración con fuchina fenicada ordinaria o azul de metileno, de uno a dos minutos.

CAPÍTULO II

CULTIVO DE LOS MICROBIOS

Lo primero que habremos de tener en cuenta al tratar de cultivar los microbios es su enorme difusión por toda la superficie del globo, pudiendo decirse que costaría trabajo encontrar un espacio, por pequeño que sea, desprovisto de microbios. Esto dificulta, naturalmente, el desarrollo de un microbio determinado o un corto número de especies a voluntad nuestra, y no puede ser conseguido en tanto no nos veamos libres de los que existan en los medios que utilicemos y, sobre todo, de los que accidentalmente puedan llegar, desenvolviéndose a la par que los que nos interesan y constituyendo lo que se llaman impurificaciones.

Una vez que hayamos destruído los gérmenes existentes en todos los instrumentos y medios que hayamos de emplear, bastará para obtener los cultivos terrenos o medios apropiados para que los microbios puedan desenvolverse, colocarlos en condiciones físicas convenientes y, por último, verificar todas las operaciones siguiendo ciertas reglas que eviten las impurificaciones y nos permitan conservar las especies cultivadas indefinidamente.

I. — Procedimientos de esterilización

Los procedimientos usados en los laboratorios de bacteriología se basan en el empleo del calor, en la filtración por materiales porosos que no consientan el paso de los microorganismos y en la acción de las substancias antisépticas.

A) Por el calor.

Es el agente más generalmente empleado solo o asociado al vapor de agua para facilitar su penetración y su acción.

1.° *Calor seco.*

Flameado. — El procedimiento más sencillo de aplicar el calor seco consiste en someter los objetos a la acción de la llama de un mechero de alcohol, gas, etc., hasta el rojo, como se hace corrientemente con el asa de platino que utilizamos en las siembras, con las agujas de platino de las jeringas y, en general, con todos los objetos pequeños de platino que se ponen con facilidad al rojo (unos 1.300°) sin estropearse. Con los objetos de otros materiales, hierro, cristal, etc., que se estropean sometidos a las temperaturas altas, bastará pasarlos unas cuantas veces por la llama para que adquieran la temperatura suficiente sin alterarse; de todos modos evitaremos el someter a la acción del calor seco los instrumentos de corte, y los de corte delicado, como los bisturíes, deberán ser esterilizados con alcohol, éter, ácido fénico, etc., para prescindir del calor por completo.

Esterilizadores por aire caliente. — En general son cajas de hierro de dobles paredes, con el espacio comprendido entre la doble pared tabicado de modo tal, que el aire caliente, producido por un fuerte hornillo de gas, petróleo, alcohol, etc., pasa primero por la cavidad interna, es decir, en contacto con la lámina que forma la pared de la caja, y después por la externa, recogiéndose en la parte inferior o superior, en donde se encuentra el agujero de salida. Para conseguir una temperatura superior, algunos constructores han modificado la marcha del aire caliente, haciendo que pase primero por la cavidad interna de la doble pared, penetre a continuación en el interior de la caja, se ponga en contacto con los objetos en ella colocados y, por último, pase a la cavidad externa de la doble pared y salga al exterior.

En el horno de Pasteur la forma del aparato es cilíndrica, abierto en su parte superior, por donde se introducen los objetos que han de esterilizarse en un cesto de tela metálica, de la misma forma y tamaño que la cavidad, con una tapadera metálica para el cierre; los humos se recogen en la parte inferior, dándoles salida por medio de un tubo que sirve de tiro; el esterilizador de Chantemesse y los construídos por la ma-

yor parte de los fabricantes tienen forma rectangular, vertical (figura 28) o apaisada y con la salida de humos superior, y tanto éstos como aquéllos pueden ser de dimensiones distintas. Frecuentemente hállanse protegidos contra la pérdida de calor por láminas de amianto que tapizan sus caras por fuera.

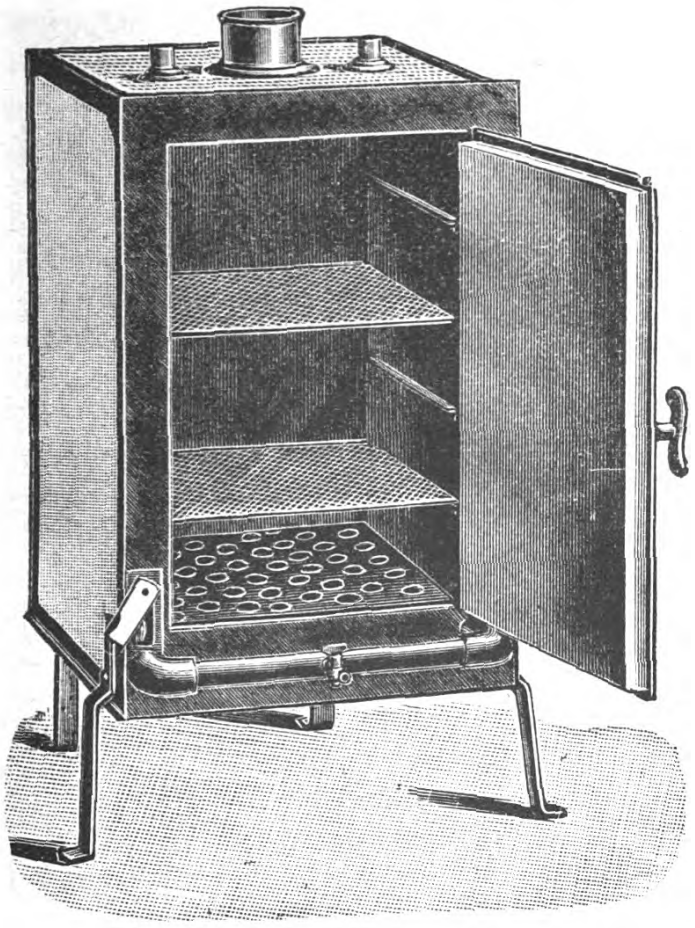


Fig. 28. — Esterilizador por aire caliente.

Estos aparatos son empleados para la esterilización de los matraces, frascos, ampollas, placas de Petri, probetas, pipetas y en general de todos los utensilios de cristal, de objetos de porcelana, de metal, del algodón, del papel de filtro, etc. Todos los objetos que hayamos de esterilizar deberán estar perfectamente limpios y secos, pues de lo contrario, si son de cristal,

saltan con facilidad y además salen manchados; deben estar muy bien envueltos en papel para evitar que se impurifiquen en el momento de sacarlos, y si poseen cavidades que se puedan cerrar con facilidad (frascos, matraces, tubos, etc.), ocluiremos los orificios de salida con algodón antes de envolverlos en el papel; si las bocas son muy grandes, pueden cerrarse mediante hojas de papel sujetas en torno con hilo o bramante; en una palabra, el ingenio del operador se esforzará para que todos los objetos que se hayan de esterilizar estén protegidos convenientemente contra los microbios que puedan depositarse sobre su superficie o en su interior.

Una vez preparados todos los utensilios se colocan en el interior del esterilizador, teniendo en cuenta que por muy bien construídos que estén, la repartición del calor no es igual por todos sus puntos, siendo la temperatura más alta en la parte inferior, y que el algodón de los tapones, y en general todos los objetos que se alteran a temperatura relativamente baja, no estén en contacto con las paredes. A continuación se cierra el aparato, se cuida de que el termómetro esté colocado en el orificio que a través de la pared o la tapadera llega hasta el interior y se enciende el hornillo o mecheros.

Cuando la temperatura del termómetro es de 180°, se arregla la combustión del hornillo para que se mantenga durante media hora, y al cabo de este tiempo se apaga y se deja enfriar antes de proceder a su apertura, para no producir la rotura del cristal por enfriamiento rápido. Si la temperatura, a pesar de nuestros esfuerzos, por deficiencias del foco calorífico no llega a 180°, podremos valernos de una temperatura inferior, siempre que llegue por lo menos a 140 o 150°, con tal de sostenerla mucho más tiempo (de una a dos horas). Una temperatura superior a 180° tiene el inconveniente de estropear rápidamente el algodón y el papel, que salen tostados y hasta carbonizados por completo, produciendo vapores que ensucian y atacan el cristal, y por añadidura son antisépticos, oponiéndose posteriormente al desarrollo de los microbios. El color ambarino de los tapones de algodón indicará que la temperatura ha sido suficiente.

2.° *Calor húmedo.*

Ebullición. — Constituye el modo más sencillo de aplicar el calor húmedo, pero si bien destruye las formas adultas de todos los microbios, no consigue la segura destrucción de los esporos, a menos de que no se prolongue su acción durante cinco horas o se apele a la esterilización fraccionada, de que nos ocuparemos después. Ahora bien, si tenemos en cuenta que la mayor parte de las bacterias patógenas no son esporuladas, en aquellos casos en que no se sospeche la existencia de bacterias

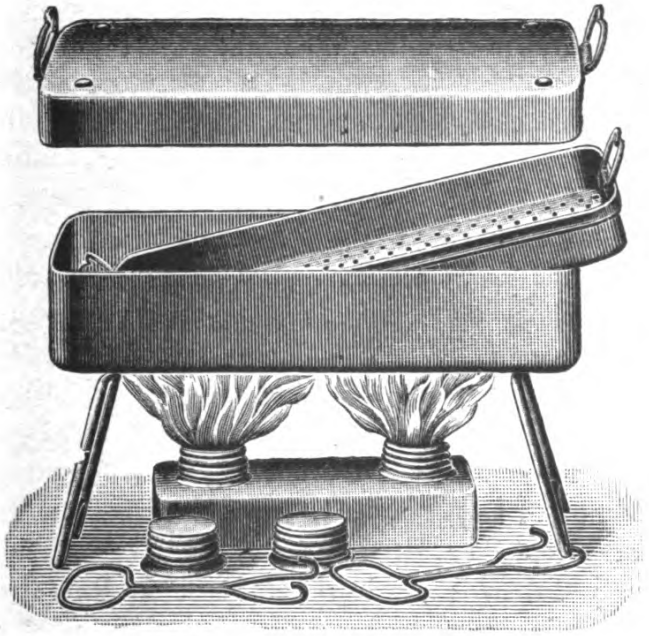


Fig. 29. — Esterilizador por ebullición del agua.

patógenas esporuladas y la contaminación por saprofitos no sea muy abundante, podremos verificar la esterilización por ebullición. De esta manera se obtiene de ordinario la esterilización de los instrumentos utilizados en las autopsias y operaciones, y la de las jeringas de inyección, valiéndose de los esterilizadores de Schimmelbusch. En estos aparatos (fig. 29), los instrumentos, colocados en cestillos metálicos, se sumergen en una disolución de soda del 1 al 5 por 100, con lo que se obtiene una temperatura superior a 100°, pudiendo llegar a 104°, con lo

que en un cuarto de hora se consigue una esterilización suficiente.

Autoclavos. — Para conseguir temperaturas superiores a la indicada es necesario valerse del vapor de agua comprimido, pues sabido es que si el agua hierve a 100° a la presión de una atmósfera, con atmósfera y media hierve aproximadamente a 112°, con dos a 121° y con tres a 135°, y, por consiguiente, si hacemos que el agua hierva en una cavidad cerrada de paredes suficientemente resistentes, con sólo calentar cada vez con más energía levantaremos la temperatura al grado que deseemos.

Los autoclavos (fig. 30) son resistentes calderas de cobre de forma cilíndrica con el suelo cóncavo y la parte superior cerrada por una fuerte tapadera, también de cobre, ajustada mediante un grueso aro de goma y que se sujeta sobre la caldera por medio de tornillos de presión; esta caldera va colocada sobre *otra* armadura de hierro que la envuelve, la sostiene y a la par hace que el calor se distribuya sobre toda la superficie; la calefacción se consigue mediante hornillos de gas, petróleo, alcohol, etcétera, colocados debajo de la caldera; los objetos que han de ser esterilizados van colocados en un cestillo de tela metálica con sostenes, de fondo plano, quedando una cavidad entre el fondo cóncavo de la caldera y el plano del cestillo; finalmente, como todos los aparatos que han de soportar presiones producidas por el vapor de agua, en la tapadera, o en uno de los lados de la caldera, lleva un tubo para la purga de aire, un manómetro y una válvula de seguridad. No hay que decir que se construyen de dimensiones variadas y algunos están dotados de mecanismos muy perfeccionados que permiten el cierre simultáneo de todos los puntos de la tapadera con gran ahorro de tiempo.

En estos aparatos se hace la esterilización de los objetos de goma y de los terrenos de cultivo que no aguantan sin sufrir profundas alteraciones, una temperatura de 140° en seco. Para practicar la esterilización de los autoclavos, se colocan en éste los objetos y medios de cultivo, se vierte en el fondo de la caldera agua sin que llegue a tocar el fondo del cestillo, se cierra el aparato aprisionando fuertemente la tapadera mediante los tornillos de presión, solamente con las manos, se

abre, si no lo estaba, la llave de salida del vapor y se afloja todo lo posible la válvula de seguridad; en seguida se prende

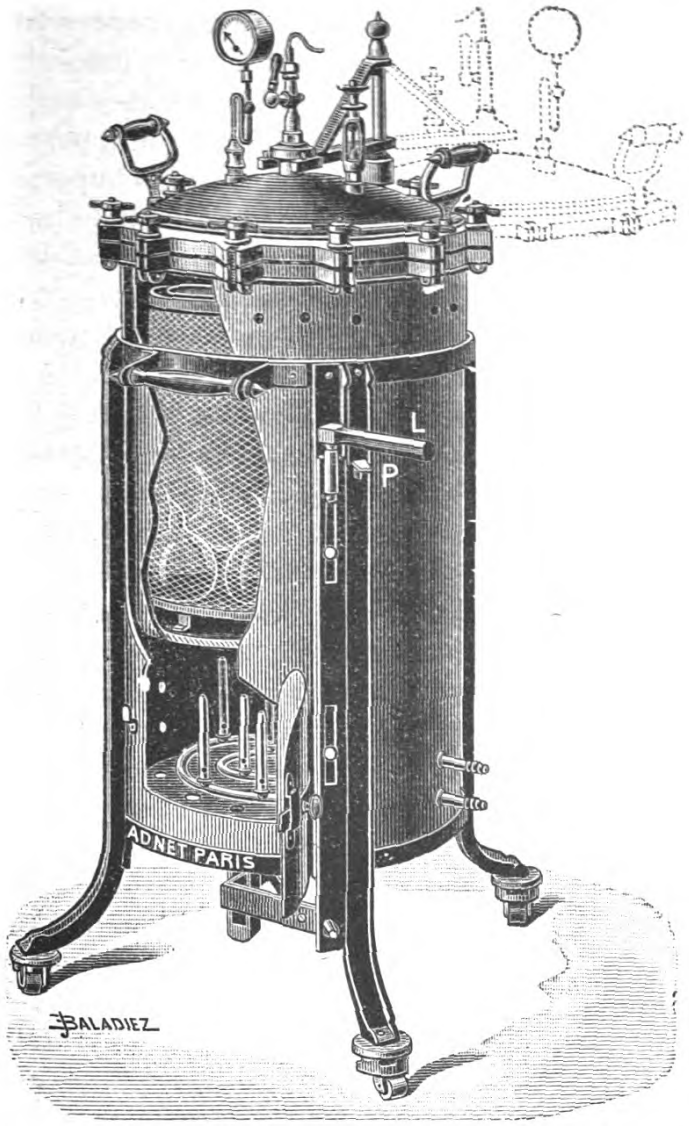


Fig. 30. — Autoclave de Chamberland para esterilizar los caldos y vasijas destinadas a las culturas. La temperatura sube hasta 120 y 134°.

fuego al hornillo y se espera hasta que comience a salir el vapor; éste, al principio, sale de un modo intermitente, pero después de un rato, cuando forma un chorro continuo y se proyec-

ta a alguna distancia, se cierra la llave de salida, con lo que inmediatamente comenzará a fluir por la llave de seguridad; se regula ésta para que no se abra antes de la presión que deseemos y se vigila el manómetro; cuando la presión alcanza el límite deseado, se apaga una de las filas de mecheros del hornillo para que se mantenga la presión durante quince minutos a media hora y después se apaga por completo para que se enfríe. Solamente cuando se haya restablecido la presión normal por enfriamiento, abriremos primero la llave de salida del vapor y a continuación la tapadera; en caso contrario, nos exponemos a serios contratiempos por la presión y la temperatura elevada del vapor que quede en el aparato. Tampoco debemos producir una descompresión rápida abriendo la salida del vapor, porque entonces todos los líquidos hierven tumultuosamente, se mojan los tapones y hasta se proyectan, haciendo inútil todo el trabajo y estropeando el material.

Las esterilizaciones son practicadas, generalmente, por el personal auxiliar de los laboratorios, muy presto a descuidos, por lo que será conveniente comprobar si la esterilización fué eficaz o no; para ello se recomienda el colocar dentro del autoclavo substancias fusibles a temperaturas próximas a la que es posible alcanzar, a fin de asegurarnos si la temperatura necesaria fué alcanzada, empleándose el benzonaftol que funde a 110°, el azufre y la antipirina a 114°, la resorcina a 119° y el ácido benzóico a 121°, solos o mezclados con substancias colorantes (safranina, verde brillante) para que al fundirse se tiñan, pero si bien todos estos medios nos dicen qué temperatura fué alcanzada, no indican el tiempo que fué mantenida, y por consiguiente, no nos proporcionan ningún dato seguro respecto a la eficacia de la esterilización. En los laboratorios empléase un procedimiento mucho más sencillo y seguro aunque no tan brillante, que consiste en poner una pequeña porción de los terrenos de cultivo esterilizados en la estufa de cultivos; si la esterilización fué eficaz se mantendrá, y en caso contrario vegetarán los microbios que no murieron, demostrando de manera indiscutible que la esterilización no fué completa y debe repetirse.

Esterilización discontinua y prolongada. — La esterilización por vapor a presión es la más usada en los laboratorios franceses

y españoles para la preparación de los terrenos de cultivo, y sólo cuando se trata de materias muy alterables, se recurre a otros procedimientos; en los laboratorios alemanes, juzgando que las temperaturas de 110 a 120° que se emplean en los autoclavos les pueden restar condiciones alimenticias, prefieren verificar las esterilizaciones a 100°. Ahora bien; como hemos dicho antes, esta temperatura no garantiza una completa esterilización por no destruir seguramente los esporos, y es necesario apelar a la esterilización fraccionada ideada por Tyndall o a una esterilización prolongada, según las indicaciones de Pasteur, o a los dos procedimientos a la par.

El procedimiento de Tyndall esta basado en que una temperatura de 100° mata seguramente las formas microbianas adultas, pero no los esporos, pero si repetimos la esterilización a las veinticuatro horas, en este tiempo una gran parte de los esporos habrán germinado transformándose en microbios y pereciendo, por consiguiente, en la nueva esterilización, y si después de veinticuatro horas de esta segunda esterilización hacemos otra tercera, agotaremos, seguramente, todos los esporos y microbios, quedando el medio completamente estéril. Quizás, como opina Duclaux, el proceso no sea tan sencillo y entren en juego otros factores, como la disminución de resistencia de los esporos por calentamiento repetido en atmósfera húmeda, pero el hecho práctico es que de esta manera se consigue una esterilización segura de los medios de cultivo.

En esta disminución de resistencia de los gérmenes ante un calentamiento prolongado, se funda el procedimiento de Pasteur, y de él hemos hecho ya una aplicación al ocuparnos de la esterilización por el calor seco, al decir que si no podíamos conseguir la temperatura de 180°, podíamos utilizar una inferior prolongándola más; con el calor húmedo podemos proceder del mismo modo, sometiendo los medios de cultivo a una temperatura de 100° o inferior, prolongándola tanto más cuanto más baja sea, siempre que pase un límite que comience a ser perjudicial para los microbios.

La aplicación del vapor de agua sin presión puede hacerse en los mismos autoclavos con sólo dejar abierta constantemente la llave de salida del vapor, cuidando de reponer el agua de cuando en cuando para que no falte y se estropee, pero se hace

mejor en los esterilizadores por vapor fluente, de los cuales el tipo es el de Koch. Estos se hallan formados por una caldera cilíndrica de cobre, en cuya parte inferior, frecuentemente ensanchada, está contenida el agua que ha de hervir, y en su centro y parte superior contiene los cestillos para los objetos que se han de esterilizar; la abertura superior se cierra por una tapadera sin presión, en la que va colocado el termómetro; lateralmente la caldera lleva láminas de fieltro para evitar la pérdida de calor y un tubo indicador del nivel del agua en la caldera. Para su funcionamiento se coloca en la caldera agua hasta la señal indicada en el nivel, se ponen los objetos en el cestillo, se tapa y se enciende el hornillo; cuando después de algún tiempo se escapa vapor en abundancia, se arregla el mechero para que continúe la ebullición del agua durante media hora, al cabo de la cual se apaga. Repitiendo la esterilización otra media hora en cada uno de los dos días siguientes, se consigue una esterilización completa, pero si queremos aplicar el principio de Pasteur, prolongaremos la primera y única esterilización dos o más horas.

Tratándose de medios muy alterables por el calor, como el suero sanguíneo que se coagula, puede utilizarse la esterilización discontinua y prolongada a unos 56° sometiendo el suero durante siete días consecutivos a dicha temperatura, una hora cada día por medio de baños-maría cubiertos, provistos de termo-regulador para que la temperatura se mantenga todo el tiempo y no pase.

B) Filtración.

Si hacemos que un líquido que contenga microbios atraviese por un material poroso, pero de poros tan finos que permitan el paso del líquido, mas no el de los microbios que se encuentran en suspensión, el líquido que haya atravesado se encontrará libre de estos seres. Los materiales porosos utilizados en bacteriología son la porcelana, la porcelana de amianto, la tierra silícea, formada principalmente por diatomeas (Kieselgur), la arcilla y el asbesto, que se disponen de ordinario en forma de tubos de dimensiones distintas, cerrados por uno de sus extremos y terminados por el otro en un estrechamiento

olivar o tetina por donde sale el líquido filtrado al través de la pared y reciben el nombre de bujías. Algunas, como las Pukall, tienen forma de pera o botella.

Las bujías se dividen en duras y blandas, incluyendo entre las primeras las constituídas por materiales provistos de poros más finos y por consiguiente más resistentes al paso de los microbios, como son las Chamberland de porcelana B y F, la primera más compacta que la segunda, las de Garros de porcelana de amianto, las de Berkefeld de tierra silícea y las de Pukall de arcilla, y entre las segundas las de asbesto de Heim. La dureza de las bujías tiene una importancia grande, debiendo guardar una íntima relación con la naturaleza del líquido filtrado y la magnitud de los microbios que hayan de quedar retenidos en sus poros; cuanto mayor sea el contenido del líquido en materias albuminoideas, su paso será más difícil, conviniendo desde este punto de vista el empleo de bujías de poros grandes; pero a medida que facilitamos el paso de los líquidos, facilitamos también el de los microbios; por estas razones, las bujías muy duras, como la B de Chamberland, raramente se emplean en los Laboratorios, como no sea para la demostración de la filtrabilidad de los más diminutos gérmenes, ya en el límite de la visibilidad, y son usadas corrientemente la F de Chamberland y la de Berkefeld.

En los laboratorios de bacteriología empléase la filtración para la esterilización de líquidos que no soportan la acción del calor de ninguna manera sin perder ciertas propiedades que es preciso conservar, o para separar de los terrenos donde hemos cultivado determinados microbios, el medio con las substancias solubles que se han agregado por la vida de dichos seres y los cuerpos microbianos. También se utiliza la filtración para la obtención del agua estéril, pero es preferible considerar el agua filtrada solamente como relativamente esterilizada, y en todos los casos en que deba serlo, utilizar la esterilizada por el calor.

La filtración del agua se obtiene por los dispositivos corrientes ya en la higiene casera, es decir, los filtros sin presión, consistentes en grandes vasijas, donde se coloca el agua que se ha de filtrar, quedando sumergida en ésta la bujía, cuya terminación olivar o tetina comunica con otro recipiente que re-

coge el agua filtrada, o formado por un gran vaso de material poroso que se llena de agua, recogiendo la que se filtra a través de su pared en la parte inferior de la vasija continente, y los filtros a presión, compuestos de una armadura metálica, de forma cilíndrica generalmente, soldada a la conducción de agua a presión de las ciudades, que encierra la bujía de Berkefeld (fig. 31) o Chamberland (fig. 32), de modo que entre la

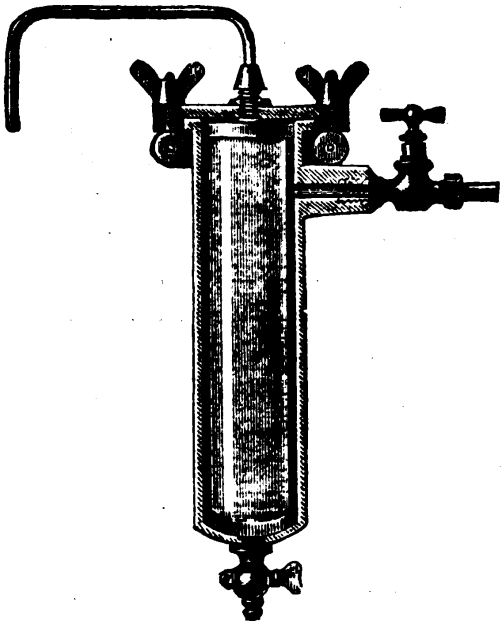


Fig. 31. — Filtro Berkefeld.

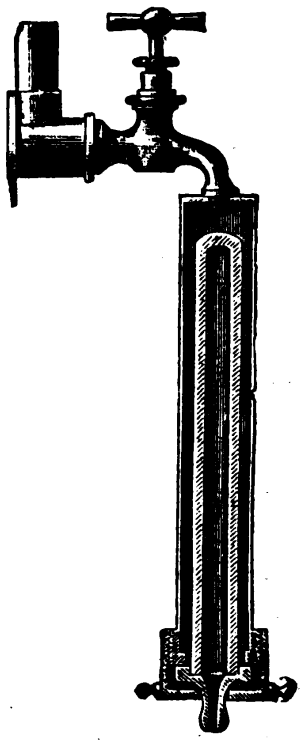


Fig. 32. — Filtro Chamberland.

armadura y la bujía quede una cavidad hermética, a la que llega el agua a presión, y pasando por la pared de la bujía al interior de ésta sale por la extremidad abierta.

Contrariamente a la filtración del agua, en que lo interesante es la filtración rápida de una gran masa de agua que sólo contiene algunas sales disueltas, en la filtración verificada con los otros dos objetivos se trata por lo común de filtrar una pequeña cantidad de líquido provisto de gran cantidad de materias albuminoideas y, por consiguiente de filtración difícil, debiendo ser por completo diferentes los dispositivos em-

pleados, aunque sean idénticos en sus líneas fundamentales. Ante todo, la filtración no se verifica si no es ayudada por la diferencia de presión entre las superficies exterior e interior de la bujía; esta diferencia puede obtenerse por disminución o por aumento de presión en una de las dos superficies, conservando normal la presión de la otra, diferenciándose los dispositivos según que utilicen la aspiración o el aumento de presión.

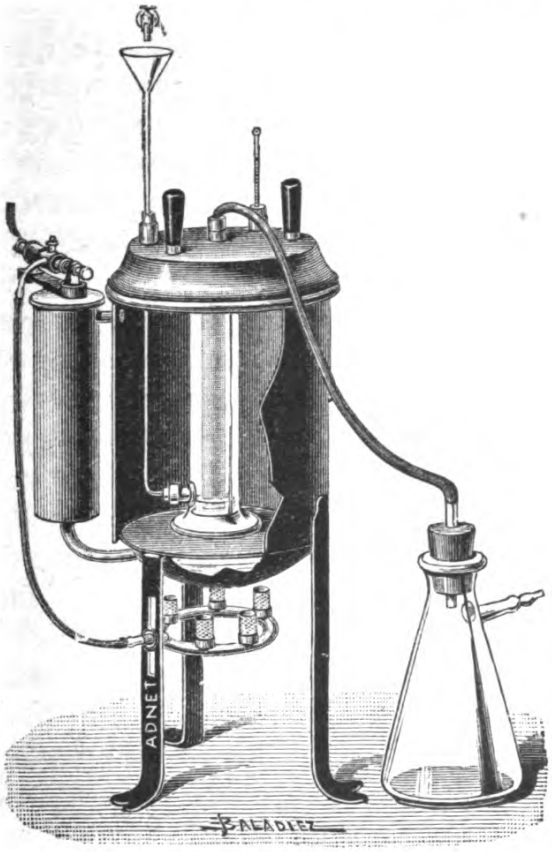


Fig. 33. — Baño-maría y filtro para esterilizar el suero sanguíneo. La probeta conteniendo la bujía se encuentra en el interior del baño-maría, en comunicación con el matraz por medio del tubo de goma.

Filtración con aspiración. — El dispositivo más sencillo consiste en colocar el líquido que ha de filtrarse en una probeta (figura 33), introduciendo en él la bujía de modo que el orificio de salida se encuentre arriba; éste se pone en comunicación, mediante un tubo de goma de paredes resistentes para que no se

aplasten al disminuir la presión, con la boca de un matraz fuerte, ocluída por un tapón de goma que ajuste bien, atravesado por un tubo de cristal; el matraz posee además lateralmente una abertura tubular, a la que se aplica otro tubo de goma, que transmite la aspiración, obtenida por una trompa de agua. Debe intercalarse siempre en el tubo de aspiración una válvula de seguridad que impida el retroceso del agua cuando deja de funcionar la trompa, y para mayor seguridad un frasco, donde se recoja el agua en caso de que retroceda a pesar de la válvula, pues si no se toman estas precauciones el agua llegaría hasta el matraz donde se recoge el líquido filtrado e inutilizaría la operación.

El filtro Martin, muy semejante al anterior dispositivo, consta de un filtro semejante a los utilizados para filtrar el agua a presión, provisto de una armadura metálica, terminada en su parte superior por un embudo para la introducción del líquido que se ha de filtrar, y de una bujía con su extremidad abierta, saliendo por la parte inferior de la armadura metálica y en comunicación, por medio de un tubo de goma, con un matraz para la recogida del líquido filtrado, y un aparato de aspiración idéntico al anterior.

En estos dispositivos, la filtración se verifica desde la superficie exterior de la bujía a la interior, mas la necesidad del tubo que une el filtro con el frasco de recolección, hace difícil ésta cuando se trata de filtrar pequeñas cantidades, siendo mucho más manejables los filtros en que la filtración se verifica de dentro a afuera, siendo uno de los más usados el de Kitasato. Consiste en un matraz fuerte con tubo lateral, como el que servía para la recolección del líquido filtrado en el primer dispositivo; la boca está cerrada por un grueso tapón de goma atravesado por un tubo de cristal continuado en su parte superior por un embudo de cristal, y en su parte inferior, dentro ya de la cavidad del matraz, se adapta por medio de gomas a la extremidad abierta de una bujía a la que sirve de sostén, estando en comunicación el embudo, el tubo y la cavidad de la bujía, pero en completa incomunicación con la cavidad del matraz; al tubo lateral se aplica un aparato de aspiración idéntico al descrito. El líquido que se vierte por el embudo pasa por el tubo al interior de la bujía y por la menor presión de la superficie

exterior sale al través de la pared recogiéndose en el matraz.

En el filtro Martin, para pequeñas cantidades de líquido, la forma del recipiente es cilíndrica y realmente no es usado para la recolección del líquido, porque éste queda en un pequeño tubo de cristal que envuelve a la bujía, a la que se sujeta por arriba mediante un aro de goma, siendo lo demás completamente igual.

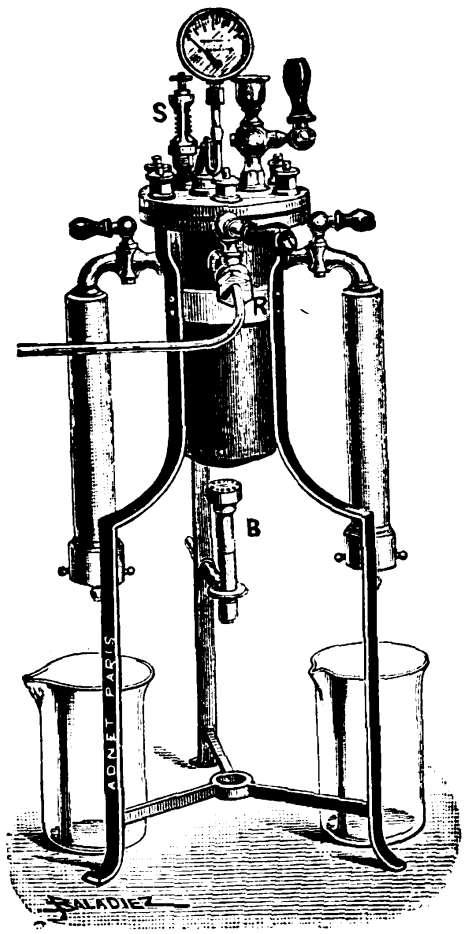


Fig. 34. — Filtro de Chamberland con presión de aire comprimido y mechero de gas.

Filtración por presión. — Se verifica por medio del aparato de Chamberland, formado por una cámara cilíndrica de cobre que en su parte superior, abierta, se atornilla, mediante tornillos de presión, una tapadera, provista de manómetro y tubo con llave para la llegada del aire comprimido por una bomba corriente; en la parte inferior de la cámara existe otro tubo provisto de llave, al que se atornilla la armadura metálica del filtro, que es semejante a los descritos anteriormente para la filtración del agua con presión.

Para filtrar con él después de esterilizado en todas sus partes, se destornilla la tapadera, se atornilla el filtro, se vierte el líquido que se va a filtrar, se repone la tapadera, sujetándola bien, y abriendo la llave que permite la llegada del aire comprimido, se procede a la filtración a una presión de dos a tres atmósferas.

Las dificultades que presenta el aparato para una esterilización perfecta, han hecho modificar el tipo del aparato en el sentido que indica la figura 34; en vez de atornillar la bujía en

la parte inferior del aparato se hace en los lados, con los que se deja libre la cara inferior, a la que puede ser aplicado un mechero, y en vez de una bujía pueden aplicarse dos o más; esto tiene por objeto el verificar la esterilización del aparato por vapor de agua a presión, pues basta colocar agua en la calderita, cerrar bien la tapadera y las llaves y calentarla, para que el vapor producido adquiera rápidamente 115 a 120° y esterilice todo el aparato y hasta las bujías, pues una vez el vapor caliente, abriendo las llaves de comunicación, se pone en contacto con ellas. Claro es que para que esta modificación no presente peligros, es preciso colocar en la tapadera una válvula de seguridad, un manómetro y un tubo con llave para la salida del vapor cuando haya que verificar la descompresión.

Reglas generales para la filtración. — 1.ª *Comprobación de la bujía.* — Frecuentemente las bujías poseen pequeñas grietas o resquebrajaduras, que aunque invisibles a simple vista, consienten el paso de los líquidos sin filtrar; para ponernos al abrigo de esta contrariedad, adaptaremos a la extremidad abierta o tetina de la bujía un tubo que esté en comunicación con una pera de goma o un aparato cualquiera de insuflación e introduciremos la bujía en una probeta con agua; inyectando aire con el aparato, si existen grietas veremos formarse burbujas de aire en la parte correspondiente de su superficie. Algunos añaden a esta comprobación la de retención de los microbios, filtrando cultivos de vibriones o bacilos que posean un sólo flagelo, siendo el *spirillum parvum* y el bacilo *fluorescens liquefaciens* los más usados.

2.ª *Esterilización perfecta de la bujía y de todos los tubos y vasijas con que haya de ponerse en contacto el líquido después de filtrado.* — La esterilización de las bujías se verificará de preferencia en el autoclavo, pero las Chamberland pueden ser esterilizadas también al calor seco, en el horno Pasteur o similares. Todos los demás utensilios se esterilizan en autoclavo o al calor seco, según su naturaleza.

3.ª *Las filtraciones no deben prolongarse demasiado.* — Una filtración muy prolongada permite que los microorganismos vegeten en la pared del filtro, e insinuándose en los poros, lleguen hasta él la superficie exterior, transformando en ilusoria la filtración. Esto se ve perfectamente en las bujías

usadas mucho tiempo en la filtración del agua y se comprueba además en las filtraciones de pequeñas porciones de líquidos, si han de prolongarse mucho tiempo por ser difícilmente filtrables.

4.ª *Esterilización subsiguiente a la filtración.* — Cuando han filtrado líquidos que contenían microbios peligrosos, antes de someter a limpieza las bujías y demás porciones del aparato, serán esterizadas cuidadosamente.

5.ª *Limpieza y regeneración de las bujías.* — Después de una filtración se limpiará la bujía frotando la superficie de llegada del líquido con cepillos apropiados, dentro del agua, teniendo en cuenta que las de Chamberland, por su mayor dureza, aguantan perfectamente esta operación, pero las Berkefeld, de un material más deleznable, deberán ser frotadas suavemente para evitar su desgaste rápido. Algunos aconsejan inyectar agua en sentido contrario a aquel en que se verificó la filtración para desalojar de materias la porción más superficial del espesor de la bujía.

A pesar de todas estas precauciones, tarde o temprano los poros del material que forma la bujía se rellenan de materias que dificultan la filtración y es necesario proceder a quitarlas, conociéndose esta operación con el nombre de regeneración de las bujías. Tratándose de microbios y otras materias orgánicas, los procedimientos de regeneración se basan en los procedimientos físicos o químicos de destrucción de aquellas materias; la combustión entre los primeros y la oxidación con el permanganato potásico entre los segundos, son los más usados.

La combustión se verifica sometiendo las bujías a la acción de un mechero Bunsen o calentándolas fuertemente en un horno de incineración. No hay para qué decir que es ésta, operación que debe practicarse con el mayor cuidado, porque con mucha frecuencia inutiliza las bujías por formación de grietas o hendiduras; las dos precauciones principales son la perfecta desecación y que el calentamiento como el enfriamiento sean graduales.

La regeneración por procedimientos químicos se consigue introduciendo la bujía en una disolución de permanganato potásico al 1 por 100 durante varias horas, después en otra de hiposulfito sódico al 5 por 100, también varias horas, y lavando

mucho tiempo en agua corriente o en agua varias veces renovada. Se puede acelerar la penetración de estos líquidos valiéndose de la aspiración o de la compresión. También se consigue la regeneración por la acción durante veinticuatro horas del ácido clorhídrico al tercio o por disoluciones de carbonato sódico o amoníaco, según aconseja Nicolle y Remlinger para las bujías Berkefeld.

C) Esterilización por medio de antisépticos.

Este modo de esterilización tiene una aplicación relativamente escasa en la técnica bacteriológica; con facilidad se comprende que si nuestro objeto es el cultivo de los microbios, la esterilización de todos los medios utilizados ha de verificarse necesariamente con agentes que dejen de actuar en cuanto hemos obtenido lo que nos proponíamos, de otro modo se opondrían también a la germinación de los microbios que cultivamos ulteriormente, y así como los medios físicos antes descritos cumplen a maravilla esta condición, los químicos son difícilmente separables, y si tratamos de conseguirlo, nos exponemos a la impurificación.

Por esta razón, en la esterilización de objetos usados en bacteriología sólo utilizamos los antisépticos con los instrumentos de corte; en la de los medios de cultivo, únicamente apelamos a ciertos antisépticos muy volátiles, como el cloroformo para quitar los microbios existentes en ciertos lotes de líquido ascítico o semejantes, y por último, se añaden pequeñas porciones de antisépticos a sueros terapéuticos y diagnósticos para evitar su impurificación, o se matan con antisépticos volátiles los microbios de ciertas vacunas. Una mayor aplicación tienen a la desinfección de materias ya utilizadas, con objeto de hacerlas inofensivas, empleándose para la desinfección de los portas y cubres que ya han servido, para la rápida inmersión de cultivos de microbios muy peligrosos, etc. En cada caso particular, expondremos los antisépticos que deben utilizarse y el modo de aplicarlos.

Finalmente, en la esterilización del campo operatorio, en la experimentación en los animales y en la de las manos del personal que trabaja en bacteriología se emplean de ordinario los

antisépticos, debiendo existir siempre en los cuartos de trabajo una jofaina con disolución de sublimado al 1 por 1.000 para desinfectarse las manos de tiempo en tiempo.

II. — Preparación de los medios de cultivo

Los medios apropiados para la vegetación de los microbios necesitan contener todos los elementos necesarios para su nutrición. Si la química biológica hubiera llegado a su completo desenvolvimiento y conociéramos qué albuminoides, grasas, hidratos de carbono, sales, y en qué proporción eran necesarias para cada microbio, la preparación de los terrenos de cultivo reduciríase a la preparación de determinadas fórmulas, de modo semejante a como se preparan en la actualidad los reactivos químicos o las substancias colorantes; pero mientras en la alimentación de los microbios como en la humana no conozcamos al detalle todas las necesidades, será forzoso que en la cocina de unos y otros sigamos empleando fórmulas empíricas, basadas en la utilización de materiales orgánicos complejos, extraídos de organismos, animales o vegetales que contengan un gran número de principios inmediatos, a fin de que cada microbio tome lo que necesite para vivir. En algunos casos solamente y por tratarse de microbios muy poco exigentes en cuanto a su nutrición, nos será posible el preparar medios de cultivo de composición química conocida.

1. Medios de cultivo de origen animal.

A) Artificiales.

En la preparación de los más generalmente usados se parte del clásico caldo.

Caldo común de cultivo. — 1.° 500 gramos de carne de vaca, bien limpia de grasa y porciones tendinosas y finamente picada, se pone a macerar en un litro de agua, doce horas en frío o media hora a 50°.

2.° Se cuece media hora para que se coagulen los albuminoides y se cuela por una franela para separar los fragmentos de carne, que se comprimirán en una prensa, a fin de extraer

todo el líquido que retengan en su masa, el cual se añadirá al líquido filtrado.

3.° Póngase el líquido en una marmita, añádanse 20 gramos de peptona Witte o Chapoteaut y 5 gramos de sal común, y disuélvanse por cocción, agitando constantemente para que la peptona no se agarre como dicen los cocineros, y se dificulte todavía más su disolución.

4.° Neutralización. Viviendo con preferencia las bacterias en medios ligeramente alcalinos, y siendo ácidos por regla general casi todos los caldos, se hace preciso darles la necesaria alcalinidad. Para ello, durante muchos años se ha empleado como reactivo indicador la tintura sensible de tornasol, y todavía se emplea en muchos laboratorios; se toca el papel rojo y el azul de tornasol con una gota del caldo, y una vez que hemos comprobado su acidez, se añade poco a poco una disolución de carbonato sódico al 10 por 100 hasta que ya no se enrojezca el papel azul y comience a azulear el rojo, en cuyo momento damos por terminada la operación.

Desde que se considera como un elemento importante en la diferenciación de muchos microbios el grado de acidez desenvuelta en los cultivos, la alcalinidad del medio tiene mucha más importancia, y no considerándose bastante sensible el tornasol para su determinación, se apela corrientemente en muchos laboratorios a la fenolptaleína, conducta que nosotros aconsejamos calurosamente. Para verificar la neutralización a la fenolptaleína, se ponen en un matracito 5 cent. cúb. del caldo y se añaden 45 cent. cúb. de agua destilada; se cuecen tres minutos a la llama y se añade 1 cent cúb. de la disolución alcohólica de fenolptaleína (fenolptaleína, 0'5 gramos; alcohol al 50 por 100, 100 cent. cúb.); en seguida, por medio de una bureta se deja caer gota a gota una disolución, $^1/_{20}$ normal de carbonato sódico, hasta que comience a formarse una tinta rosa persistente, en cuyo momento se lee la cantidad gastada de la disolución de carbonato sódico; repetida la determinación dos o tres veces para corregir los posibles errores de observación y tomando la cifra media, si ha habido concordancia en las observaciones, como indicadora de la cantidad necesaria de la disolución $^1/_{20}$ normal de carbonato sódico para llevar a punto neutro a la fenolptaleína los 5 cent. cúb. de caldo, o sea

la vigésima parte de 100 cent. cúb., la misma cifra nos indicará la cantidad de disolución normal de carbonato sódico que habremos de añadir a 100 cent. cúb. de caldo examinado para colocarlos en punto neutro a la fenolptaleína.

La neutralidad a la fenolptaleína es designada por los norteamericanos como el punto 0, más como sabemos que esta reacción aparecería alcalina con la tintura de tornasol y la reacción del medio, preferible para la vida de los microbios, por regla general, es la de neutralidad al tornasol, por varios investigadores ha sido determinada la cantidad de disolución normal de ácido clorhídrico que hay que añadir para convertir el punto neutral a la fenolptaleína, en punto neutral al tornasol, oscilando la cifra encontrada entre 1 y 2'5 por 100, habiendo aceptado muchos laboratorios la cifra de 1 por 100, pues aunque la correspondencia no sea exacta por completo, los microbios viven perfectamente con esta alcalinidad.

No todos los microbios viven con la misma reacción del medio, y para una rápida inteligencia, los americanos han convenido en designar con la cifra 0 la reacción neutra a la fenolptaleína; si la reacción es ácida a la fenolptaleína, la señalan con el signo *más* y una cifra que indica el tanto por ciento de disolución normal de carbonato sódico que sería preciso añadir para llevarla al punto 0, designándose, según esto, el punto neutro al tornasol con *más* 1; por último, si es alcalina el signo es *menos* y la cifra indica la cantidad de disolución normal de ácido clorhídrico que habría que añadir para conseguir el punto 0.

En resumen, determinada por el procedimiento indicado la cantidad de la disolución normal de carbonato sódico que debemos añadir a 100 cent. cúb. del caldo que examinamos para ponerlo al punto 0, descontaremos 1 cent. cúb. por 100 para que resulte a *más* 1, o sea neutro al tornasol aproximadamente.

Una vez determinada y añadida la cantidad correspondiente a la masa total de caldo que preparamos, se vuelve a comprobar su alcalinidad con la fenolptaleína para ver si en efecto es *más* 1, y con el tornasol para convencernos de su correspondencia aproximada.

5.º Terminada la neutralización, se coloca el caldo en una vasija de las de uso corriente para la cocción de la leche, en un

matraz de cristal o en otra vasija y se somete a la temperatura de 120° en el autoclavo durante quince minutos. Al sacar el caldo aparece sumamente turbio por la precipitación de los fosfatos, debiendo filtrarle por papel Chardin mojado. Si en esterilizaciones posteriores se pasa de 120°, vuelven a producirse precipitados, aunque en menos cantidad. Rectifíquese la neutralidad y añádase la cantidad necesaria de agua para restituir el volumen inicial o sea un litro.

6.° Distribúyase en las vasijas en que ha de ser conservado o utilizado y esterilícese de nuevo quince minutos a 120° en autoclavo.

Otras clases de caldo. — En la actualidad conócense numerosas fórmulas de caldo ideadas con el fin de responder a necesidades especiales en el cultivo de los microbios, pero todas discrepan sólo en algún punto del caldo común que acabamos de describir, pudiéndolas agrupar del siguiente modo:

1.° *Por la fuente de substancias alimenticias.* — *a)* Preparados con carne de ternera, caballo, cerdo, gallina, etc. No presentan diferencias muy marcadas, salvo el mayor contenido en glucosa de algunos animales como el caballo. *b)* Preparados con otros órganos, preferentemente placenta, hígado, bazo, riñones, intestinos y estómago, etc. *c)* Preparados con extractos de carne, sobre todo el de Liebig, poniendo en agua del 1 al 2 por 100 de extracto de carne con el 1 por 100 de peptona y 0'5 por 100 del sal, y procediendo en todo lo demás como en el caldo común, a partir del tiempo 3.°. También pueden emplearse los productos Maggi, conocidos con el nombre de Ragit. *d)* Preparados sin carne. AGUA DE PEPTONA. Peptona Witte, Chapoteaut, Defresne, etc., según los casos, de 1 a 2 gramos; sal común, 0'5 gramos; agua, 100; disolver y esterilizar con el caldo común, y en cuanto a la neutralidad, generalmente basta comprobarla por ser ligeramente alcalina, y sólo en contados casos será preciso corregirla. Cuando el agua de peptona ha de servir para la demostración del indol, será forzoso tener cuidado en el empleo de aquellas suertes de peptona que, como las mencionadas, son capaces de darla, y además se añadirá 0'01 por 100 de nitrito sódico y 0'02 por 100 de carbonato sódico cristalizado.

2.° *Por las substancias alimenticias añadidas.* — *a)* Cal-

dos con o sin hidratos de carbono. Claro es que todos los caldos preparados con carne y sus derivados, contienen desde luego hidratos de carbono, pero ya hemos dicho que no todas las carnes contienen igual cantidad, y como algunos microbios viven mejor en medios que contengan una cantidad mayor de hidratos de carbono que la contenida en los caldos más ricos en estas materias, ha sido necesario añadirlos. Por otra parte, cada día encuentra mayor utilización para diferenciar las bacterias su desigual poder fermentativo en presencia de los distintos hidratos de carbono, y si este poder ha de ser apreciado con la debida exactitud, será preciso partir de caldos a los que se haya privado de todos sus hidratos capaces de fermentar, añadiéndoles después una cantidad determinada del hidrocarbonado o hidrocarbonados, cuya fermentación haya de servirnos como elemento de análisis.

Para privar los caldos de hidrocarbonados, apélase corrientemente a una autodigestión, colocando la carne picada que está en maceración en el agua a la temperatura de 37°, durante veinte o veinticuatro horas; los fermentos acumulados en los tejidos, más los segregados por los microbios que se desenvuelven, producen la transformación de dichos principios inmediatos en compuestos orgánicos más sencillos de formas variadísimas. Después se continúa la preparación del caldo como hemos descrito. Otros prefieren preparar el caldo común, después sembrar en él colibacilo o cualquier microbio capaz de hacer fermentar los hidratos de carbono, y a las veinticuatro horas, lo esterilizan para que sirva en la identificación de otros microorganismos, después de añadir los hidratos de carbono necesarios; este procedimiento nos parece menos aceptable porque los microbios añadidos consumen albuminoides al mismo tiempo que los hidratos de carbono, disminuyendo las condiciones nutritivas del medio. En el procedimiento primero intervienen los microbios en menor proporción y no se alteran tanto las condiciones del caldo.

Con o sin eliminación previa de los hidratos de carbono, se añaden éstos, después de la total preparación del caldo, o al sacarlos del autoclavo a continuación de la primera esterilización a 120° y antes de la primera filtración. En general, debe preferirse la adición cuando el caldo ha de sufrir lo menos

posible la acción del calor, pues ésta, continuada o repetida, despolimeriza por hidrolisis los polisacáridos, cambiando, por consiguiente, de modo desconocido en cada caso, los resultados que hayan de obtenerse. Los hidratos de carbono con más frecuencia empleados, son la destrosa, levulosa, sacarosa, lactosa, galactosa, maltosa, manita, dulcita, etc.; en la porporción de 1 por 100, y de ordinario con objeto de evitar las titulaciones de la acidez, se añaden reactivos indicadores de ésta, como el tornasol, constituyendo medios especiales de que nos ocuparemos en el lugar más apropiado para cada uno.

b) Caldos glicerinados. Prepáranse añadiendo al caldo común del 2 al 6 por 100 de glicerina, con objeto de facilitar el desarrollo de algunos microbios, principalmente el bacilo tuberculoso. *c*) Con peptonas diversas. *d*) Con proporciones variables de sal común hasta el 3 por 100, empleado en el cultivo de las bacterias fosforescentes. *e*) Caldos sin la adición de ninguna materia nutritiva, fuera de las contenidas en la carne, es decir, preparados como el caldo común sin peptona ni sal, conocidos más bien con el nombre de agua de carne. Este medio es raramente empleado como medio de cultivo, pero en cambio se le prepara en grandes cantidades en los laboratorios como materia madre para la obtención de las demás fórmulas de caldo y otros medios, con sólo añadir los elementos necesarios, conservándola esterilizada en grandes recipientes.

3.° *Por su reacción.* — De éstos ya hemos dicho bastante al ocuparnos de la neutralización del caldo, y sólo añadiremos que en aquellos casos en que los ácidos producidos en la vida de los microbios son perjudiciales al objeto que nos proponemos, como ocurre en la obtención de la toxina diftérica, se preparan caldos algo más alcalinos que los corrientes, pero como no se puede rebasar un cierto grado incompatible con la vida del mismo microbio, algunos aconsejan la adición de carbonatos alcalinos insolubles como la creta, a fin de que a medida que se producen los ácidos vayan siendo saturados.

Medios sólidos. — Constituyen un gran perfeccionamiento de la técnica bacteriológica, debido a Koch, fundado en la mezcla al caldo de cultivo de una substancia fusible por el calor, que vuelve a solidificarse por enfriamiento, en forma de una materia gelatinosa, encerrando todas las propiedades nutritivas del

caldo en un soporte sólido. Las dos substancias corrientemente usadas con este objeto son la gelatina y el agar-agar.

Gelatina. — 1.° y 2.° tiempos, como para la preparación del caldo común.

3.° Añádase 1 por 100 de peptona, 0'5 por 100 de sal común y 10 a 15 por 100 de gelatina alimenticia, libre de ácido sulfuroso. La cantidad de gelatina debe guardar estrecha relación con la temperatura a que se trabaja, pues aunque la gelatina hidratada comienza a fundirse generalmente a 24 o 25°, se puede elevar algo su temperatura de fusión aumentando la concentración, siendo ésta la razón de que en invierno o en climas fríos se pueda emplear la gelatina al 8 o 10 por 100, y en el verano o en climas calientes sea preciso el utilizar del 15 al 18 por 100, sin que podamos pasar de estas concentraciones, porque el aspecto de las colonias deja de ser característico. Disolver en caliente, según se dijo, en el caldo común y agitando constantemente.

4.° Neutralícese al tornasol, o a *más* 1, empleando la fenolptaleína como indicador, poniendo un gran cuidado para que la alcalinización no sea excesiva, pues aunque eso no tuviera una gran influencia en la vida de los microbios, ayuda notablemente con la acción del calor en el rebajamiento de la temperatura de solidificación de la gelatina.

5.° Esterilización de doce a quince minutos a 112 o 115°. Como acabamos de indicar, el calor rebaja la temperatura de solidificación de la gelatina, siendo tanto más perjudicial su acción, cuanto más alta y mantenida es la temperatura a que se la somete, prefiriendo unos la esterilización fraccionada con el vapor fluente, durante quince a treinta minutos cada vez, y otros, entre los que nos contamos, una esterilización a 115°, de diez a quince minutos.

6.° Al salir del autoclavo se procede a la filtración por papel, cuidando de que no se enfríe por completo para que no se solidifique, bastando para ello que mantengamos caliente la gelatina que está sin filtrar, a fin de que el enfriamiento del filtro se compense con el calor de las nuevas porciones, que se añaden para sustituir a las que filtraron. En caso de necesidad puede verificarse la filtración con el embudo especial para filtraciones en caliente, de que nos ocuparemos al hablar del

agar, o filtrar dentro del autoclavo, que se mantiene a una temperatura moderada. Si después de la filtración la gelatina no estuviera completamente transparente se aclarará, añadiendo al líquido fundido y mantenido a unos 50° una clara de huevo, agitando para que se reparta bien, esterilizando después en autoclavo para que se coagule y arrastre todas las substancias que enturbiaban y filtrando de nuevo.

7.° Rectifíquese la reacción y repártase en los tubos en que ha de usarse, poniendo unos 10 cent. cúb. en los tubos rectos o verticales y 6 o 7 en los inclinados, por medio de un embudo de tubo largo, de modo que llegue a la mitad del tubo de cultivo e impida que la gelatina manche la parte superior y exponga a impurificaciones. Si no va a emplearse la gelatina preparada desde luego, se la distribuye en matraces.

8.° Una vez repartida, esterilícese definitivamente quince minutos a 115° y enfríese con rapidez en la posición en que haya de ser utilizada para que se solidifique.

Con facilidad se comprende, después de lo que llevamos dicho, que la gelatina puede prepararse igualmente añadiendo al caldo común preparado, como antes dijimos, la cantidad correspondiente de gelatina, disolviendo por el calor, rectificando la reacción, porque la gelatina, de ordinario, es ácida, filtrando y aclarando, si es preciso.

Agar-agar. — Esta materia, conocida también con el nombre de gelosa, se extrae de unas algas que crecen en el mar de las Indias, y es utilizada como alimento; fué introducida en la técnica bacteriológica por Angelina Hesse, y se presenta en polvo, en tallos o columnas y en cañón de pluma; está formada por hidratos de carbono, sin gelatina ni albuminoides que puedan ser peptonizados por los microbios, pero pudiendo ser hidrolizado, sobre todo por el calor, en los medios ácidos, lo que aumenta su solubilidad; hidratado, se liquida a 90°, volviendo a solidificarse a 40°; pero si ha estado sometido a fuertes temperaturas durante mucho tiempo, por la razón indicada, baja su temperatura de fusión y solidificación, y si la acción de los ácidos fuese muy intensa, puede perder por completo la propiedad de solidificarse; de cualquier manera se necesitan acciones mucho más intensas que con la gelatina.

El agar común se prepara del siguiente modo:

1.°, 2.°, 3.° y 4.° tiempos, como en la preparación del caldo común.

5.° Después de neutralizado el caldo, añádase del 1'5 al 2 por 100 de gelosa en polvo, y mejor la misma cantidad de gelosa en tallos o pluma puesta en remojo dos horas para que se hidrate, bien exprimida. Caliéntese hasta la disolución completa y rectifíquese la reacción.

6.° Esterilícese quince minutos a 120°.

7.° Filtración por papel Chardin. Este es el momento más difícil en el manejo del agar, pues es necesario verificar la operación en caliente; para ello se emplean los filtros especiales (fig. 35) formados por embudos de metal de dobles paredes, entre las que se pone agua que se calienta por medio de un mechero, y en cuya cavidad se coloca el embudo de cristal que lleva el papel Chardin y el agar filtrante que va cayendo por el tubo en un matraz donde se recoge. Como la cantidad de agua contenida en la cavidad de estos embudos nunca es grande, hay que tener constantemente un gran cuidado para que no se quede sin agua y se inutilice el aparato, resultando bastante engorroso su manejo; por esta razón, en muchos laboratorios la filtración del agar se verifica dentro del autoclavo, sin presión, protegiendo el embudo para que no caiga sobre él el agua que se condensa en la tapadera del autoclavo, diluyendo el medio. Algunos evitan la filtración recogiendo el agar después de la esterilización en una vasija de cristal de forma cilíndrica, y mejor cónica, dejando que se enfríe lentamente para que las partes no disueltas tengan tiempo de acumularse en la parte inferior de la vasija; y una vez que la solidificación es completa, invierten la vasija, la imprimen un brusco movimiento para que la masa sólida del agar se desprenda, y con

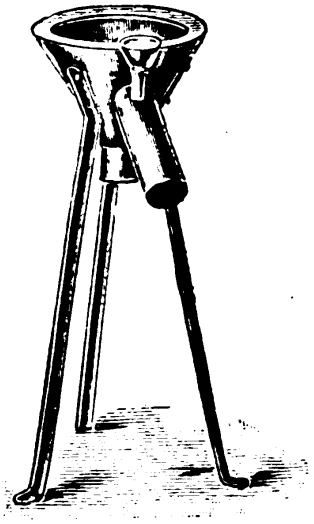


Fig. 35. — Embudo para filtración del agar en caliente.

un cuchillo o espátula separan la porción del agar donde se acumularon los precipitados.

Lo mismo que en la gelatina, si al solidificarse el agar no resulta completamente transparente, debe ser aclarado por medio de una clara de huevo, como se dijo allí.

8.° Si el agar filtrado se dejó enfriar, caliéntesele de nuevo; repártase en tubos o matraces, teniendo la misma precaución que con la gelatina para que no manche la parte alta del tubo, y esterilícese quince minutos a 120°. Al salir del autoclavo los tubos se mantienen verticales o se tienden, según que el agar haya de usarse en profundidad o en superficie, teniendo cuidado que los tubos tendidos estén lo más tendidos que sea posible, sin que el medio alcance a la porción media del tubo, a fin de que no se impurifique por su proximidad a la abertura.

El agar común se prepara generalmente en la proporción dicha; pero algunos medios especiales llevan proporciones mucho menores; y cuando el agar se ha de mezclar con otros medios, según veremos más adelante, se pone al 3 o 4 por 100, para que al mezclarse no resulte demasiado diluído.

Otras fórmulas de gelatina y agar. — Además de la gelatina y del agar común, que acabamos de describir, pueden añadirse estas materias a todas las demás clases de caldos indicadas, resultando otras tantas clases de gelatinas y gelosas.

B) Naturales.

Suero sanguíneo. — Como es sabido, se separa de la sangre durante su coagulación, y generalmente es extraído de la sangre de ternera, vaca, caballo y carnero. Basta recoger la sangre en vasijas de cristal bien limpias y esterilizadas, de capacidad proporcionada a la cantidad de sangre que se quiere obtener, y dejarlas veinticuatro horas en sitio fresco para que la coagulación tenga lugar y el suero se acumule en su parte superior, de donde se puede extraer por procedimientos distintos, todos ellos sencillísimos.

Para pequeñas cantidades bastan matraces o tubos, pero cuando se trata ya de grandes cantidades, se suelen utilizar vasijas de cristal de forma de tronco de cono con la sección mayor inferior, de la que sobresale un vástago de cristal que

tiene por objeto sujetar el coágulo en el momento de inclinar el frasco para la extracción del suero. Se facilita la extracción del suero, a las pocas horas, separando el coágulo de la pared por medio de alambres o espátulas o utilizando frascos especiales, que como el de Latapie, tienen en su interior un gran número de tubos de vidrio fenestrados que constituyen a modo de drenaje.

El suero obtenido puede ser esterilizado por el procedimiento de Tyndall o conservándole unos meses con cloroformo, pero es mucho mejor que no sufra esterilización de ninguna clase, bastando para ello el recoger la sangre en perfecta asepsia y verificar las restantes operaciones con la misma precaución. La sangre se puede obtener en el mismo matadero, haciendo que de los vasos de los animales degollados con limpieza, pase directamente al recipiente donde se ha de coagular; si tenemos el animal a nuestra disposición en el laboratorio y ha de ser sacrificado por otras razones, podemos proceder del mismo modo, es decir, poniendo al descubierto un buen trozo de la carótida con la mayor asepsia, y sujetándola con una pinza, cortarla con rapidez, dirigiendo el chorro al recipiente; pero si no hay necesidad de sacrificar el animal, se pone al descubierto la yugular y se introduce en ella un trócar fino armado de un largo tubo de goma que conduce la sangre hasta el recipiente, todo ello escrupulosamente esterilizado, o sin tubo de goma, haciendo que el chorro de sangre salte directamente a la vasija recolectora.

Para extraer el suero formado, se flamea la boca de la vasija, se destapa, y bien inclinando gradualmente ésta para que salga el suero sin desprenderse el coágulo o valiéndose de pipetas, se transporta a matraces o porrones donde se conserva hasta el momento de distribuirlo en las vasijas en que ha de ser utilizado.

El suero se emplea líquido, rara vez puro, de ordinario mezclado con caldo y otros medios de cultivo, y con más frecuencia, solidificado por la acción del calor, recibiendo el nombre de suero gelatinizado. Para ello se distribuye el suero sólo o mezclado con una tercera o cuarta parte de caldo glucosado al 1 por 100 (suero de Löffler), o con otros medios, en tubos de cultivo, poniendo 5 o 6 cent. cúb. por tubo, o en placas de Pe-

tri; se tienden en bandejas de madera como los tubos de agar inclinado, y se someten dos o tres horas a la temperatura de 70 o 75° en atmósfera húmeda, para producir la coagulación del suero, que se transforma en una masa gelatinosa transparente y opalina, si la temperatura no pasó mucho de la indicada, y más resistente, blanca y opaca, si la temperatura subió bastante.

Para la gelatinización del suero, empléanse en los laboratorios aparatos especiales consistentes en cajas metálicas cuadradas de dobles paredes, que se cubren con tapaderas de cristal dobles, apoyadas en cuatro pies, metálicos también, a dos de los cuales se puede dar dimensiones variables, con lo que se consigue que el suelo del aparato tenga la inclinación que deseemos; se llena de agua la cavidad de la doble pared, se calienta por un mechero, accionado por un termorregulador, para que la temperatura sea constante, y se coloca un termómetro; se disponen los tubos en la caja, de modo que el suero no alcance nunca a la mitad del tubo, se añade una vasija con agua para que mantenga la humedad, y después de tapar se enciende, procurando reglar el aparato de modo que la temperatura se mantenga a 70° durante el tiempo que sea preciso, para que los tubos se puedan invertir, sin que el suero se desprenda. Estos aparatos, aunque convenientes, porque facilitan el trabajo, pueden ser sustituídos por otros varios y hasta por un simple baño maría, siempre que nos atengamos a las indicaciones hechas.

La esterilización se comprueba, poniendo los tubos o placas en la estufa a 37° veinticuatro horas, resultando completamente estériles si las operaciones se verificaron con limpieza; pero si se quiere tener la seguridad de la esterilización sin perder ni un solo tubo por la impurificación, se somete a una esterilización fraccionada a 95° tres días consecutivos, con lo que se acaba de perder la transparencia del medio, que generalmente no añade nada al estudio de las colonias que en él se forman.

Sangre.—Se emplea mezclada a los demás medios de cultivos para el desarrollo de ciertos microbios que necesitan la hemoglobina. La sangre se recoge en un matraz esterilizado, provisto de perlas de cristal en su interior; inmediatamente que

ha penetrado la sangre se hace girar el recipiente para que las perlas vayan destrozando los hilos de fibrina formados e impidiendo la coagulación, debiendo continuarse la agitación del matraz lo menos cinco minutos después. Una vez desfibrinada la sangre, se añade a los medios con que ha de mezclarse; si el medio es agar, será necesario fundirlo y enfriarlo a 40° antes de añadir la sangre. De ordinario, se pone 1 cent. cúb. de sangre por tubo. Para el cultivo de algunos microbios, como el de la influenza, basta frotar la superficie del agar en unas gotas de sangre.

Leche. — Se utiliza la leche desnatada por decantamiento, y mejor por centrifugación. Después de distribuída debe ser esterilizada fraccionadamente tres días a 100°, o en autoclavo a 110°, debiendo tenerse en cuenta que una temperatura superior a ésta la torna morena. Pruébese la esterilidad en la estufa de 37° durante veinticuatro horas.

Derivados de la leche. — La leche, además de constituir un terreno abonado para el desarrollo de un gran número de microbios, proporciona datos importantes para su caracterización por la fermentación de la lactosa y la coagulación de la caseína; pues bien, con objeto de separar estos dos elementos diagnósticos o ponerlos más claramente de manifiesto, se han preparado medios especiales, en que la leche es añadida de reactivos indicadores de la reacción o sustituída por la nutrosa o el suero de leche, mezclados con dichos indicadores. En la identificación de los microbios nos ocuparemos de estos medios especiales.

Huevos. — Pueden emplearse enteros para la siembra de microbios con sólo agitarlos fuertemente para que se mezclen la clara y la yema, lavando bien la cáscara con sublimado caliente al 5 por 1.000 y un cepillo, enjuagando con agua esterilizada y secando con un paño estéril; después se pincha por uno de sus extremos, se introduce por el orificio la aguja de siembra y se cierra el orificio con papel y colodión, con lacre o de cualquier otro modo semejante. Este procedimiento es raramente empleado, porque con mucha frecuencia los huevos no están estériles.

Es preferible lavar perfectamente la cáscara con jabón y cepillo, después con sublimado y, finalmente, con agua estéril; escurrirla bien o secarla con un paño estéril, abrir un ancho

orificio con un instrumento aséptico y verter el contenido del huevo en un matraz esterilizado; después se agita con una varilla, de modo que se mezclen la clara y la yema, sin que se forme espuma, y sólo el huevo así preparado o mezclado con otros medios, según veremos en la técnica especial, se distribuye en tubos de cultivo o en placas y se solidifica, como hemos indicado, para el suero sanguíneo. También se puede emplear la clara o la yema aisladas, separándolas, como hacen los cocineros.

2. Medios de cultivo de origen vegetal.

Igualmente que los de procedencia animal, pueden ser líquidos o sólidos, pero siendo los microbios patógenos bastante exigentes en su nutrición, son mucho menos empleados que éstos. Los líquidos están formados por infusiones o maceraciones de heno, paja, patata, zanahoria, judías, levadura, malta, etcétera, en proporción variable con el producto empleado, oscilando del 1 al 10 por 100; después de dos o más horas de maceración en el agua, se pasa el líquido al través de un lienzo fino para separar las porciones más gruesas, se filtra por papel el líquido, se reparte y se esteriliza.

El medio sólido de procedencia vegetal más frecuentemente utilizado es la patata. Sea cualquiera la disposición que hayamos de darlas, necesitamos valernos, en primer término, de patatas buenas, siendo preferibles las holandesas, y en segundo lugar, deben ser lavadas, esterilizadas con todo esmero, porque en su cubierta contienen un gran número de microbios y algunos de ellos provistos de esporos muy resistentes, impurificándose con mucha frecuencia.

Para ello, las patatas serán lavadas en agua corriente al mismo tiempo que se frota fuertemente su cubierta con un cepillo; por medio de un cuchillo se separan los ojos y manchas que presenten y se las coloca en una disolución de sublimado al 1 por 1.000 durante media hora; a continuación se las lava en agua para arrastrar el sublimado, se quita la cubierta en los extremos del eje mayor, se introduce el cuchillo cilíndrico especial y se extrae un cilindro que por medio del cuchillo plano,

se secciona a su vez por la diagonal de modo que resulten dos cuñas. Cada una de estas cuñas es colocada con la parte más gruesa hacia abajo en uno de los tubos especiales para el cultivo en patata esterilizada; estos tubos son algo más gruesos que los corrientes y presentan por encima de su fondo una estrangulación en que queda detenida la patata, pues el cuchillo talla los cilindros de diámetro poco menor que el interior del tubo de cristal. También pueden ser empleados tubos corrientes colocando en el fondo una pequeña varilla de cristal que impida el que el trozo de patata descienda hasta el fondo y se ponga en contacto con el agua de condensación. Una vez distribuídas las patatas, se esterilizan una hora a 110 o 120° o tres veces a 100° durante media hora cada vez.

Las patatas extraídas del sublimado pueden ser dispuestas también en discos colocados en dobles plaquitas de cristal esterilizadas, después de peladas, sometiéndolas a la misma esterilización que los tubos. Finalmente, pueden ser empleadas en forma de pulpa, después de cocidas en agua o leche, distribuída en matraces Erlenmeyer en capas de un centímetro de espesor aproximadamente.

La mayor parte de los microbios crecen bien en las patatas con su reacción ácida normal, pero algunos necesitan forzosamente una reacción alcalina, y en estos casos prepararemos las patatas después de haberlas tenido durante varias horas en una disolución de soda al 1 o 5 por 1.000. Las patatas pueden recibir también otras substancias que aumentan sus condiciones nutritivas para determinados microbios, como la glicerina empleada en el cultivo del bacilo tuberculoso, según veremos cuando nos ocupemos de este microbio.

III. Métodos generales empleados en el cultivo de los microbios.

1. Siembra.

Consiste en llevar al terreno de cultivo dispuesto en continente apropiado, previa la necesaria esterilización, una cantidad del germen que pretendemos cultivar, proporcionada a la

masa del terreno. Claro es que sería suficiente la presencia de un sólo microbio para que en sucesivas y rápidas generaciones aumentara de una manera ilimitada en tanto que el terreno no resultara esquilmado, pero por rápidas que sean las particiones de los microbios, fácilmente se comprende que requieren un tiempo determinado por su vitalidad y las condiciones en que el cultivo se desenvuelve y tardarán en adquirir el máximo de desarrollo más o menos tiempo, según la masa de terreno sembrada.

Instrumentos. — En la *siembra de pequeñas cantidades de gérmenes* utilízase, de ordinario, el alambre de platino montado sobre una varilla de cristal, haciendo que el platino penetre en el extremo de la varilla reblandecido por el calor, o colocado en porta-agujas especiales, siendo el de Kolle uno de los más usados. El hilo de platino puede ser recto en toda su longitud o estar retorcido en su extremo libre en forma de asa o anillo proporcionado al grosor del hilo, debiendo tener en cuenta que siendo necesaria su esterilización por la llama en todas las siembras, y después de ellas, cuanto menor sea el grosor del hilo con mayor rapidez se consigue, teniendo esto más importancia de lo que parece en la rapidez de las operaciones y hasta en el éxito de las siembras, pues con frecuencia se esterilizan por no haber dejado enfriar suficientemente el platino. La excesiva finura presenta también inconvenientes, pues el hilo se tuerce al menor choque y se hace quebradizo más pronto con los sucesivos calentamientos. De ordinario se utilizan en los laboratorios hilos de platino de 0,3 a 1 milímetro de espesor, siendo los de 0,5 a 0,7 los más usados.

Para la *siembra de grandes cantidades de gérmenes* utilízanse gruesas asas de platino, o las espátulas de platino cuando el material que se ha de sembrar procede de un medio sólido y de pipetas de cristal si procede de medio líquido. Como pipetas pueden emplearse las corrientes, debidamente esterilizadas, pero dado el extraordinario gasto que de ellas se hace en los laboratorios de bacteriología, son preparadas en el momento de utilizarlas, siguiendo a Pasteur, empleando tubos esterilizados de 4 a 10 milímetros de diámetro de 20 a 25 centímetros cúbicos de longitud, esterilizados al calor seco, después de ocluídas sus extremidades con algodón. Valiéndose de

un mechero Bunsen o una llama de alcohol, se calienta hasta el reblandecimiento una gran porción de su parte media, y separando los extremos con rapidez, estiraremos el centro de modo que se produzca un estrechamiento capilar de unos 30 a 40 cent. cúb. de longitud, que cortaremos por el centro valiéndonos de la misma llama. Si el reblandecimiento es escaso, obtendremos estrechamientos cortos y gruesos, y si el calentamiento es excesivo, se cortará la varilla antes de que hayamos podido estirarla.

Reglas generales. — No se deben dictar reglas precisas para verificar las siembras; antes al contrario, resulta preferible el dar a conocer al principiante los fundamentos que le han de guiar en la práctica de las siembras para que dentro de sus condiciones especiales forme una técnica individual.

1.° *Las siembras deben ser practicadas de modo que no se añadan nuevos gérmenes al que queremos sembrar, ni en el nuevo terreno, ni en el antiguo.* Para ello antes de abrir la vasija que contenga la semilla se flameará el algodón, que la cierra, para destruir los gérmenes que hayan podido depositarse en su superficie, y después de retirado el algodón, la boca del tubo o vasija continente. No se introducirá una sola vez el hilo de platino en la semilla o en el terreno a sembrar sin haberlo flameado y haberlo dejado enfriar. Se procurará que entre las bocas de las vasijas que contienen el terreno a sembrar y la semilla exista el menos espacio posible, para que al llevar la aguja de uno al otro recipiente no tengan ocasión de depositarse gérmenes distintos. En tanto que se mantienen abiertas las vasijas, los tapones de algodón que las cerraban serán sostenidos con la mano, sujetándolas por la parte exterior o quemada, o se depositarán sobre superficies esterilizadas. Se colocarán las vasijas con una inclinación tal, que los gérmenes que descienden de la atmósfera no penetren en su interior, y huiremos de las corrientes de aire que, modificando este descenso, puedan motivar su introducción. Una vez repuestos los algodones de cierre de modo que vuelva a introducirse en la misma posición que tuvieron, deben ser flameados de nuevo.

2.° *Debe cuidarse en todo momento que los gérmenes contenidos en los recipientes de cultivo no se pongan en contacto con los objetos exteriores, en evitación de posibles conta-*

gios, sobre todo cuando se trabaja con los microbios patógenos, que son los que preferentemente han de ocuparnos. En cumplimiento de esta condición, cuidaremos escrupulosamente de que no se vierta la más mínima porción de la semilla, al inclinar las vasijas, al transportarla de un recipiente al otro ni al abandonar el instrumento que nos ha servido para practicar la siembra, que será esterilizado con el mismo cuidado que antes de sembrar, por flameamiento, si se trata del hilo de platino o por inmersión en substancias antisépticas si usamos la pipeta. En caso de que se vierta algo del cultivo durante la siembra o por fractura de alguna de las vasijas, se someterán a una rigurosa desinfección cuantos objetos hayan podido ser alcanzados por los microbios, inmediatamente después del hecho.

Siempre que sea posible se prescindirá de ayudantes que facilitan la comisión de faltas, por muy adiestrados que estén.

Siembras en medios líquidos. — Para sembrar de tubo a tubo, nosotros colocamos el tubo-semilla y el estéril en la mano izquierda después de flameados; con el pulgar e índice de la derecha cogemos la aguja de siembras como una pluma de escribir, la flameamos, y con los demás dedos de esta mano destapamos y sujetamos los tapones de los tubos; en seguida introducimos el hilo en la semilla, procurando que no toque en las paredes del tubo ni al entrar ni al salir, y sin sacudimientos le llevamos al tubo estéril; después de introducirle en el medio a sembrar, se flamea de nuevo el hilo de platino y se reponen los algodones.

Si la siembra se verifica de matraz a tubo, o viceversa, o entre dos matraces, si éstos son pequeños pueden ser sostenidos por la mano izquierda, procediéndose del mismo modo que si se tratara de tubos; en caso contrario se dispondrán sobre la mesa de trabajo, procurando que estén inclinados convenientemente, valiéndonos de un soporte de madera formado de dos tablas perpendiculares, una horizontal, provista de depresiones para el cuerpo de los matraces, y otra más pequeña vertical, con muescas que sirven de apoyo al cuello.

Siembras en medios sólidos. — *En la superficie.* — Dispuesto todo como para la siembra en medios líquidos, se toca con el asa de platino la semilla y después la superficie del terreno

estéril, y según toquemos puntos discontinuos, el eje mayor en forma de estría recta u ondulada o toda la superficie recibe estas denominaciones en puntos, en estría o en superficie.

En la profundidad. — Por picadura. — Empléase la aguja recta; después de tocar la semilla, se introduce en el tubo a sembrar, manteniendo éste vertical con la boca hacia abajo, procurando que penetre por el eje del cilindro, que forma el terreno, tan profundamente como creamos conveniente. También se puede hacer la siembra por picadura, manteniendo el tubo oblicuo como en las siembras en superficie. Si los medios llevan algún tiempo preparados, se condensan por desecación y se hacen frágiles, lo que da por resultado que al penetrar la aguja, aunque sea fina, se hiende el medio, y para evitar esto antes de sembrarse deberá fundirse el medio y solidificarlo de nuevo, con lo que recobra su antigua elasticidad.

Por diseminación. — Después de fundido el medio que ha de ser sembrado se enfría a 40°, si se trata de la gelosa o menos si es la gelatina; se siembra como en el caso de un medio líquido, y haciendo girar con precaución el tubo, se procura que el germen se distribuya con igualdad por toda la masa del medio; en seguida se solidifica con rapidez, manteniendo el tubo vertical.

Cualquiera que sea el procedimiento de siembra utilizado siempre que trabajemos con la gelatina, tendremos especial cuidado en no sujetar los tubos o matraces por el sitio donde se encuentra la gelatina, para evitar que se funda con el calor de las manos.

2. Incubación.

Para que se desarrollen los microbios que hemos depositado en el medio de cultivo mediante la siembra, es preciso que los coloquemos en las condiciones necesarias de temperatura y luz. Desde luego, es bien conocido el hecho de que la luz, aunque sea difusa, constituye un elemento nocivo para la vida de los microbios y que aun los más resistentes perecen en una luz, aunque sea difusa, como se mantenga el tiempo preciso; de modo que todos los locales donde hayan de mantenerse los cultivos durante su desarrollo, deberán estar en plena obscuridad;

es más, siempre que necesitemos trabajar con los cultivos, procuraremos que estén a la luz el menor tiempo posible, y en caso de necesitar una iluminación algo prolongada en los locales destinados a la incubación, procuraremos obtenerla mediante una luz roja o de escasa actividad química.

En cuanto a la temperatura, tendremos en cuenta que la mayor parte de los microbios patógenos se desenvuelve mejor a temperaturas próximas a 37°; que algunos, como el antracis y la peste, prefieren temperaturas próximas a 30°; que las siembras en gelatina no pueden incubarse a temperatura superior a 22° para evitar su liquefacción independientemente de las exigencias de los microbios, y que solamente algún microbio, más saprofito que patógeno, será tan poco exigente, en lo que a la temperatura se refiere, que pueda ser incubado a la del laboratorio con sólo preservarle de la luz. Tendremos necesidad, pues, de disponer de un armario no diáfano para el desarrollo de estos últimos microbios y para la conservación de todos los demás una vez que han llegado al completo desenvolvimiento, porque si son mantenidos a la temperatura óptima, envejecen mucho más rápidamente y se pierden, y de recintos de temperatura constante a 37, 30 y 22°, que reciben el nombre de estufas de cultivo. En laboratorios completamente surtidos de material será conveniente también la existencia de estufas a otras temperaturas: a 42°, para los análisis bacteriológicos de aguas; a 55°, y más, para los microbios termófilos; a 4°, para diagnósticos de peste y estudios de aguas superficiales contaminadas.

Estufas de cultivo.— En esencia, todas son cajas o armarios de distintas formas, calentados por un foco calorífico, gas, petróleo, electricidad, del cual se regla la intensidad por medio de aparatos termorreguladores en relación con la temperatura interior, y según que el calentamiento se verifique directamente por el aire caliente o por intermedio del agua, surgen dos tipos distintos de estufas.

Estufas por aire caliente. — La más usada es la de Roux (figura 26). Tiene la forma de un armario de madera con portezuelas de dobles cristales para defenderle del enfriamiento, tapizado de cobre en su interior, con varios entrepaños de metal, según sus dimensiones, para colocar los cultivos, atravesada

de abajo a arriba por unos tubos de cobre adosados a las paredes que conducen el aire caliente desde el mechero colocado debajo del armario hasta la parte superior del aparato, donde se recogen en la chimenea de salida y sirven para la calefacción.

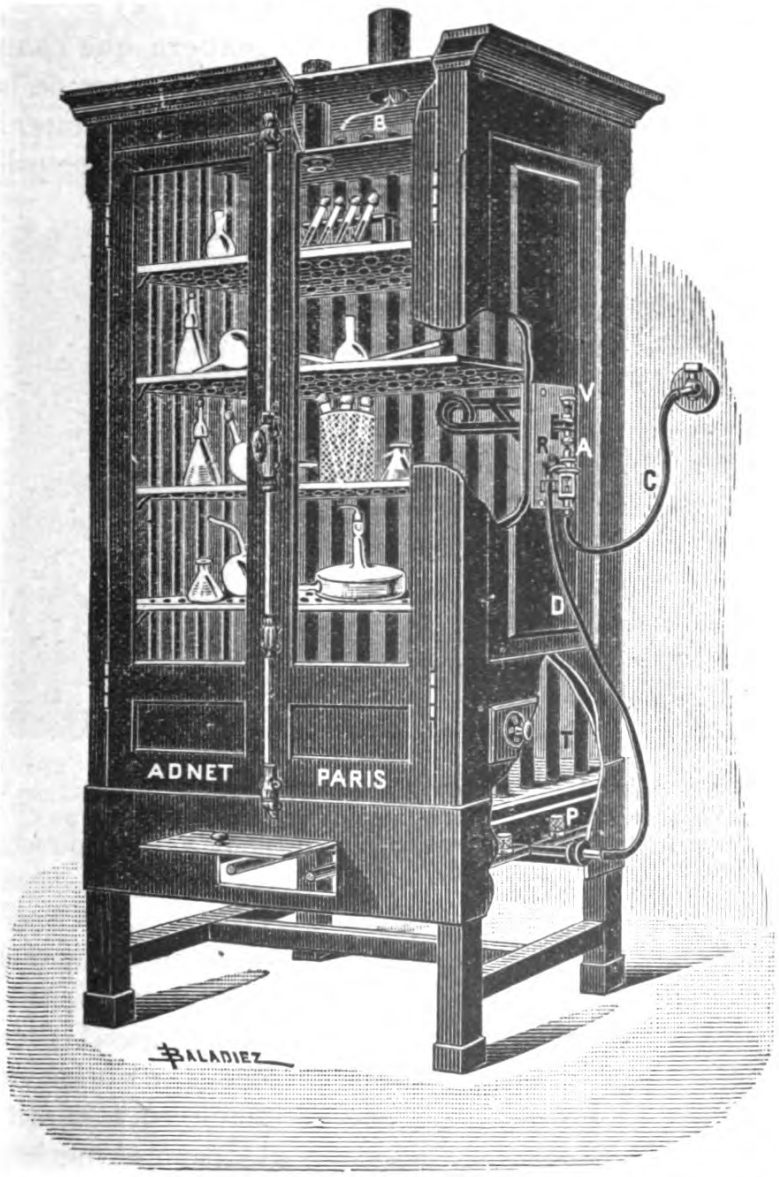


Fig. 36.—Estufa de Roux con termorregulador metálico. —P, parrilla de calefacción; T, tubos de conducción del aire caliente; B, chimenea de salida de éste; R, termorregulador metálico; V, rama móvil y tornillo para regular a mano; A, vástago metálico que cierra o abre la caja de distribución del gas; C, tubo de llegada del gas; D, tubo que une el termorregulador con el mechero.

Lateralmente presenta varios orificios que se pueden abrir o cerrar a voluntad para la ventilación del espacio interior y los extremos del termorregulador metálico (fig. 36 R y 37). Este tiene la forma de U y está constituído por dos láminas soldadas en toda su longitud, de zinc, más dilatable, la externa, y de acero, menos dilatable, la interna; de manera que cuando la temperatura se eleve, se aproximarán los extremos de las ramas de la U, y se separarán cuando se enfríe; manteniendo fija una de las ramas de la U todo el movimiento se verificará

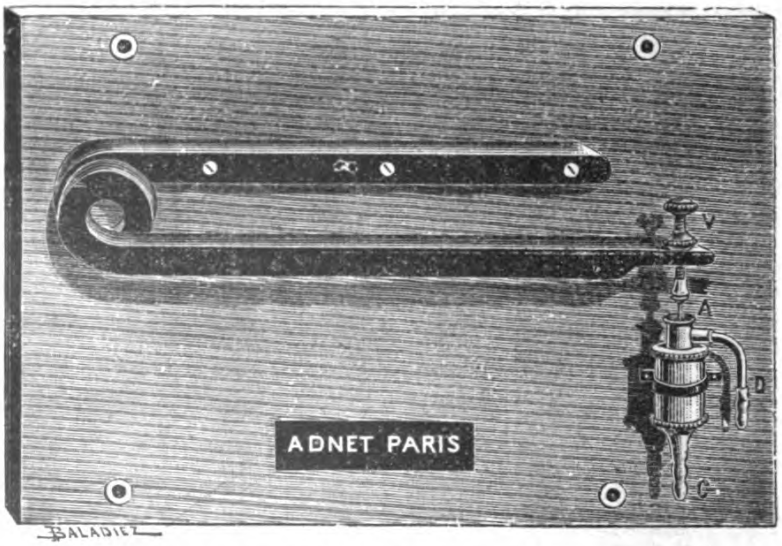


Fig. 37. — Detalles del termorregulador metálico de Roux. — V, tornillo con el que se actúa sobre la caja registradora del gas; A, pistón empujado por dicho tornillo; C, D, tubos para el gas, que saliendo por C, irá al mechero.

a expensas de la rama libre, y si ésta se halla unida por un pequeño vástago metálico en la dirección del movimiento (V) a la válvula (A), que abre o cierra la entrada del gas (D); cuando la temperatura suba se cerrará la entrada y se abrirá cuando baje. Por medio de tubos de goma se ponen en comunicación el tubo D con la conducción del gas y el C, con el mechero.

Si la estufa no ha de estar colocada en un cuarto obscuro, será necesario cubrir los cristales de las portezuelas con paños o papel negro.

Estufas por agua caliente. — Son cajas o armarios metálicos de dobles paredes, entre las que se pone una gran cantidad de

agua que sirve de intermedio para el calentamiento y en la que se sumerge el termorregulador. Por fuera hállanse protegidas contra el enfriamiento rápido del metal por un revestimiento general de linoleum, y las portezuelas de cristal son dobles. La superficie metálica inferior generalmente es acanalada, para aumentar la superficie de irradiación del calor, y las medianas y grandes están provistas de entrepaños de rejilla metálica para la colocación de los cultivos.

Los modelos más pequeños, que son los que llevan los laboratorios transportables, se calientan por medio de un quinqué de petróleo provisto de un gran depósito; y nosotros, que hemos tenido ocasión de experimentarlas largamente, hemos podido convencernos de que con algún cuidado y colocándolas en habitaciones no muy expuestas a enfriamientos repentinos, se mantiene la temperatura sin grandes oscilaciones. Es preferible, sin embargo, el empleo de los termorreguladores, y en las de alguna dimensión no se puede prescindir de su uso.

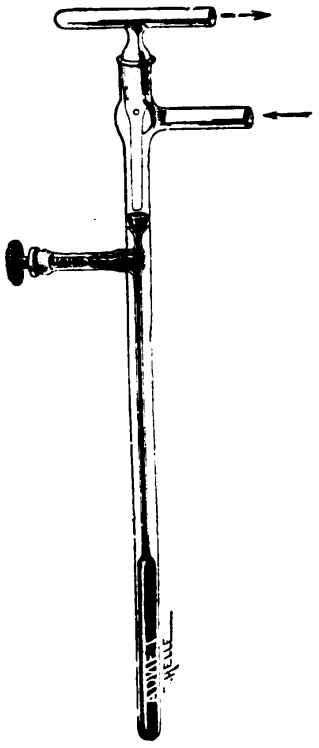


Fig. 38.—Termorregulador de mercurio.

En las estufas por agua caliente puede emplearse el regulador metálico de Roux, transformado en una lámina metálica recta introducida en una armadura metálica fenestrada para que el agua penetre con facilidad; formada la lámina metálica por la soldadura de otras dos desigualmente dilatables y estando perfectamente fija por una de las extremidades, fácilmente se comprende que las diferencias de temperatura se traducirán por deformaciones de la lámina, que se encorvará, y estos movimientos serán transmitidos a la entrada del gas de la misma manera que en el termorregulador anterior. En el de Lequeux o de acción directa, los dos metales están separados, formando el menos dilatable el eje y el más dilatable una envoltura exterior, resultando

que, estando fuertemente sujeto el eje, las dilataciones de la envoltura se hacen perceptibles en la impulsión que dan a la lámina que acciona la válvula de cierre.

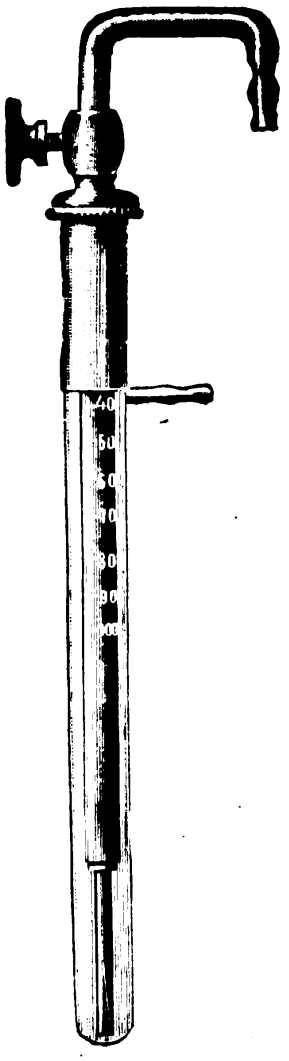


Fig. 39. — Termorregulador de mercurio y eter.

En esta clase de estufas son mucho más usados los termorreguladores de mercurio (fig. 38), formados por un tubo de cristal que contiene mercurio, cerrado en su parte superior por un tapón esmerilado hueco, prolongado hacia abajo en forma de cono afilado y provisto lateralmente de otro tubo. Poniendo la afiladura del tapón próxima a la superficie del mercurio, cada vez que éste se dilate ascenderá e impedirá la salida del gas. En las estufas grandes en que la masa del mercurio contenido en el termorregulador hacía necesario el empleo de cristales muy gruesos, con lo que la temperatura llegaba torpemente al mercurio, y por otras razones, ha sido necesario aumentar la sensibilidad de estos termorreguladores, sumando a la lenta dilatabilidad del mercurio, la rapidísima de los vapores de éter, construyendo los termorreguladores de mercurio y éter (fig. 39). Estos constan de un grueso tubo de cristal tabicado aproximadamente al nivel de su cuarto inferior por un diafragma en embudo, también de cristal, con el pico del embudo prolongado en espiral hasta muy cerca del fondo del tubo grueso, donde se abre; éste queda dividido, por consiguiente, en dos cavidades que se comunican por medio del tubo espiral del diafragma; en la parte alta existe, como en el de mercurio, un tubo lateral y un cierre metálico por donde se introduce un tubo metálico terminado en pico de flauta y que puede ser introducido más o menos dentro del grueso tubo de cristal. Si dentro de la cavidad inferior se introducen unas gotas de éter y después se rellena

dicha cavidad, el tubo espiral de comunicación y una parte de la cavidad superior de mercurio, en cuanto el éter se caliente, se transformará en vapor que se dilatará rapidísimamente con los aumentos y, no pudiendo salir, comprimirá al mercurio, obligándole a salir por el tubo espiral a la cavidad superior, cerrando más o menos la terminación en pico de flauta del tubo metálico por donde circula el gas.

En las antiguas estufas de Arsonval (fig. 40) la cavidad del agua presentaba una ventana cerrada por una membrana elástica de goma o metal, y enfrente de ella abocaba el tubo de conducción del gas; cada vez que la presión de la pared aumentaba en los ascensos de la temperatura por mayor altura del nivel, la membrana se abombaba, cerrando la salida del gas. Pero por una parte la forma de estas estufas ofrece pocas comodidades en el trabajo, y por otra las membranas pierden rápidamente su elasticidad, dejando de funcionar el termoregulador, siendo éstas las razones de que dichas estufas sean poco empleadas en la actualidad

Los progresos de la electrotecnia, en lo que va de siglo, ha hecho que cada vez sean más utilizadas las estufas por calefacción eléctrica, regulándose la intensidad de la corriente, que calienta las resistencias, por artificios semejantes a los descritos.

Estufas para temperaturas inferiores a la de la habitación. — En éstas, en vez de un calentamiento regulado, necesitamos rebajar la temperatura del agua que las envuelve. Para ello se hace que tan pronto como la temperatura del agua suba por encima de la deseada, penetre un chorro de agua que ha atravesado un serpentín colocado entre hielo, suspendiendo la entrada en cuanto hemos alcanzado nuestro propósito; esto se consigue automáticamente colocando dentro del agua un termómetro de máxima, dispuesto de modo que en cuanto llega a la temperatura límite cierra una corriente eléctrica por medio del mercurio, que se intercala entre los dos reóforos de platino que lleva el termómetro; al cerrarse el circuito acciona un electro-imán y éste tira del extremo de una palanca, que por el otro abre la válvula, que impide la entrada del agua fría. En cuanto la temperatura baja se abre el circuito y se cierra la entrada.

En nuestros climas, las estufas destinadas a los cultivos en gelatina, que han de estar reguladas a 22°, necesitan durante

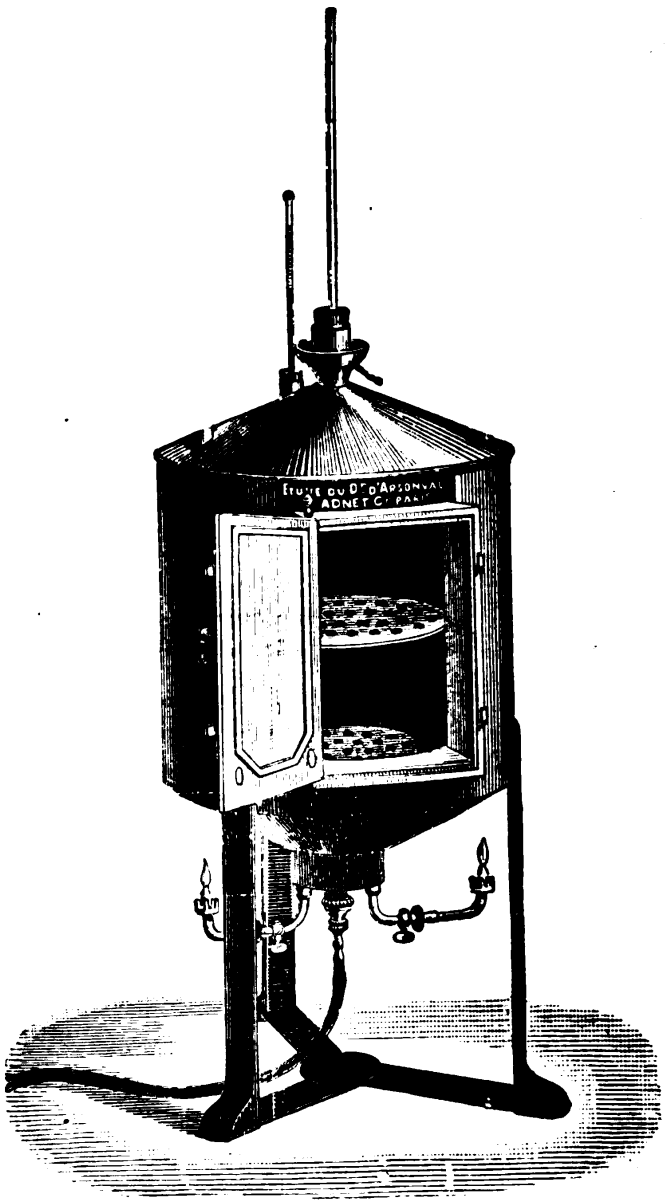


Fig. 40.—Estufa de Arsonval con termorregulador de membrana metálica.

el invierno la calefacción y en verano la refrigeración, ambas reguladas, existiendo excelentes aparatos, como los de Bitter

y Kolle, Hearson, etc., que, dotados de ambos mecanismos, prestan grandes servicios.

Grandes estufas de cultivo. — En los Laboratorios en que el trabajo es muy grande, además de poseer numerosas estufas de los modelos indicados anteriormente, se suelen disponer habitaciones-estufas. Son pequeñas habitaciones, protegidas contra el enfriamiento, a ser posible con dobles paredes, entre las cuales existe una gruesa capa de aire, sin más aberturas que una chimenea de ventilación provista de válvula de cierre manejable a voluntad y una doble puerta, que permite la entrada sin el peligro de que se enfríe; presentan en sus paredes estantes para la colocación de gran número de cultivos, y su calefacción se consigue por un gran hornillo de gas, colocado en el centro del cuarto, regulado en su combustión por un gran termorregulador metálico Roux o como en la existente en el Instituto Nacional de Higiene, verdadero modelo en su clase, por circulación de agua, que se calienta mediante un hornillo de gas, dispuesto en la antecámara, con doble autoregulación, una accionada por la temperatura del agua para la intensidad de la combustión del gas y otra regida por un regulador colocado en el interior de la estufa, para la cantidad de agua que ha de circular por la tubería de calefacción en un momento dado.

Estufas para observaciones microscópicas. — Con objeto de estudiar al microscopio la germinación de los esporos y la multiplicación de los microbios, podemos utilizar las cámaras calientes descritas en las técnicas histológicas corrientes de Ranvier, Pfeiffer, etc., que se colocan en la platina del microscopio y dentro de ellas la preparación que se va a observar; pero es preferible el empleo de las pequeñas estufas de cultivo con su correspondiente termorregulación, en que se introduce el microscopio entero, como la Plehn representada en la figura 41.

Reglas generales para el manejo de las estufas. — Para poner en marcha las estufas, después de rellenar de agua la cavidad de la doble pared, o desde luego si son por aire caliente, se prende fuego al mechero y se aguarda a que la temperatura llegue al grado deseado; en este momento, por medio del tornillo V del termorregulador metálico (fig. 37), por el tornillo lateral

del de mercurio, o introduciendo más o menos el tubo de conducción del gas en los de mercurio y éter, se consigue que la llama baje hasta casi extinguirse por completo, y así que hayamos hecho esto tantas veces como se llegue a la misma temperatura, se extinguirá el foco calorífico y se mantendrá la temperatura, pues en cuanto la temperatura descienda volverá a intensificarse la llama; con pocos tanteos conseguiremos nuestro objeto, por regla general.

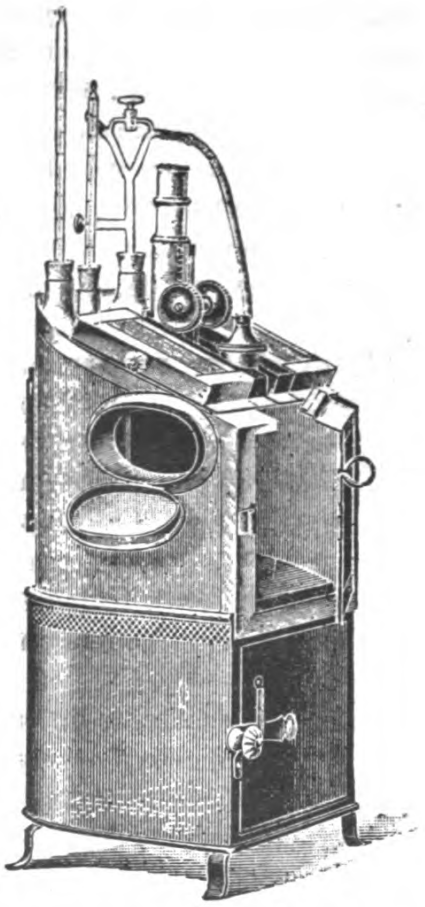


Fig. 41. — Estufa de Plehn para observar el desarrollo de los microbios al microscopio.

Todos los sistemas de calefacción empleados en las estufas de cultivos, siempre que funcionen con gases, necesitan tener una llama de seguridad y un cierre automático para los casos de total apagamiento. Fácilmente se comprende que si por el funcionamiento del regulador o por la falta del gas empleado en un momento dado se apaga por completo el mechero, en cuanto el termorregulador se enfríe o vuelva el gas, no se prenderá de nuevo y continuará saliendo sin quemarse, esparciéndose por la habitación donde se encuentra la estufa y exponiendo a serias explosiones. Por esta razón, todo termorregulador debe estar construído de manera que en ningún momento interrumpa por completo el paso del gas, sino que debe dejar pasar siempre la cantidad necesaria para mantener una llama que por su pequeñez no influya en la temperatura de la estufa y sea capaz, en cambio, de encender la llama principal cuando la circulación del gas se restablece.

De la misma manera es peligrosa la interrupción de la circulación del gas porque falte en la conducción general del edificio, pues en este caso se apagará hasta la llama de seguridad y nos encontraremos en el mismo peligro que hemos indicado. Para evitarlo, se emplean los cierres de seguridad de Koch y similares. Están accionados por una palanca que se apoya por su extremo en la rama móvil de una espiral metálica colocada sobre el mechero y la llama de seguridad, siempre que la espiral esté caliente por el mechero, pues en cuanto se enfría cambia de posición, deja de prestar apoyo a la palanca y ésta cae cerrando la conducción del gas definitivamente.

3. Incubación de los microbios anaerobios.

En el cultivo de los microbios aerobios sólo hemos tenido que preocuparnos de colocarlos, una vez sembrados, en la obscuridad y a una temperatura determinada; en el cultivo de los anaerobios, además de tener aplicación cuanto acabamos de decir para la siembra e incubación de los microbios en general, tendremos que eliminar el oxígeno del aire, que les es nocivo.

Desde luego, es preciso privar el terreno de cultivo del oxígeno disuelto, por medio de la ebullición, antes de verificar las siembras, y generalmente se añade a todos los terrenos de cultivo del 1 al 2 por 100 de glucosa para que obre como reductora sobre las pequeñas porciones de dicho gas. Para impedir que se disuelva en el medio nuevas cantidades de oxígeno, pueden emplearse distintos dispositivos.

Presencia en los medios de substancias fuertemente reductoras. — Este procedimiento se aplica a los cultivos en medios líquidos, y fué ideado por Tarozzi, constituyendo uno de los más sencillos por no exigir instrumentos especiales, ni el aislamiento entre la atmósfera y el interior de las vasijas de cultivo. Consiste en la introducción, en el medio de cultivo, de trocitos de órganos (1 gramo para 10 cent. cúb.) riñón, hígado, bazo, cerebro, etc., que ejercen su acción reductora aún después de cocidos, lo mismo que órganos vegetales como la patata y ciertos reductores minerales, como la esponja de platino. El medio de cultivo debe llenar por lo menos, para disminuir la relación

entre la superficie libre o disuelta y el volumen, dos tercios del tubo o vasija y deben evitarse las agitaciones del líquido que facilitan la disolución del oxígeno.

Obstáculos mecánicos a la penetración del oxígeno. — En los cultivos en medios líquidos basta colocar sobre la superficie del caldo una capa de unos 3 centímetros de aceite, vaselina o parafina líquida, que no disolviendo el oxígeno constituyen un gran elemento aislador entre la atmósfera y el medio privado de él por la ebullición. Cuando se trata de medios sólidos, como la penetración del oxígeno se hace difícilmente, llenando con el medio dos tercios del tubo de cultivo, al cabo de los días necesarios para el desarrollo del microorganismo no ha penetrado más que hasta 1 o 2 centímetros por debajo de la superficie, quedando el resto de la masa libre de oxígeno y perfectamente dispuesta para el crecimiento de los microbios, por muy anaerobios que sean.

Eliminación por el vacío. — Los anteriores procedimientos sólo pueden tener aplicación a los cultivos en profundidad, sea en medios sólidos o líquidos; para los cultivos en superficie se necesita quitar el oxígeno del aire contenido en la vasija de cultivo y cerrar ésta de modo que no vuelva a penetrar en todo el tiempo que dure la incubación.

Este procedimiento exige el empleo de tubos, matraces y, en general, vasijas especiales que tengan un tubo para ponerlos en comunicación con el aparato que verifica el vacío. Después de verificadas las siembras, se cierra herméticamente la boca a la lámpara, se verifica el vacío por medio de la trompa de agua o la bomba de mercurio y se cierra el tubo del vacío a la lámpara también. Además de necesitar un material especial, resulta muy engorroso y muy difícil de practicar, pues si tenemos en cuenta que no conseguimos el vacío absoluto y lo más que hacemos es diluir más o menos el aire contenido, se comprenderá que en muchas ocasiones quedará todavía la suficiente cantidad de oxígeno para dificultar el desarrollo de los anaerobios en la superficie.

También se pueden obtener los cultivos en anaerobiosis por medio del vacío, con tubos y matraces ordinarios, colocando las siembras en campanas cerradas herméticamente y hasta en estufas (fig. 42), en las que se hace el vacío.

del oxígeno por gases inertes. — Requiere vasijas es- vistas de dos tubuladuras para la extracción del rculación del gas merte una lateralmente y otra a el tapón de goma c las dos laterales, además de gas generalmente empleado es el hidrógeno pre- a granalla de cinc y el ácido sulfúrico en el apara-

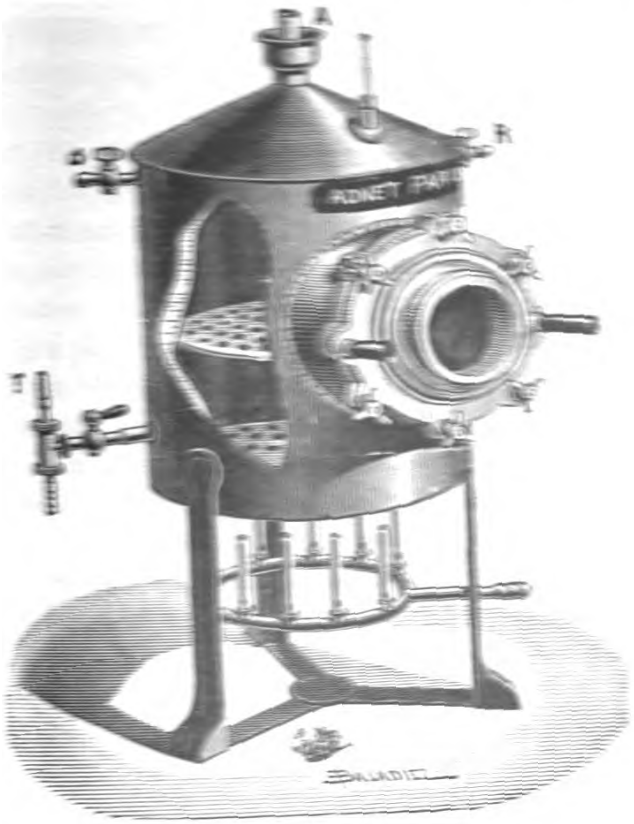


Fig. 42. — Estufa para cultivos en el vacío.

de Kipp, con todos sus accesorios; una vez verifica- ibra, se pone en comunicación uno de los tubos con de agua y la otra con el generador del gas, de modo smo tiempo que se extrae por aspiración el aire con- el tubo o matraz, va penetrando hidrógeno; mante- ta circulación bastante tiempo, el aire es reemplaza- completamente por el hidrógeno, ardiendo con su característico al salir por un tubo afilado; para evitar

entre la superficie libre o disuelta y el volumen, dos tercios del tubo o vasija y deben evitarse las agitaciones del líquido que facilitan la disolución del oxígeno.

Obstáculos mecánicos a la penetración del oxigeno. — En los cultivos en medios líquidos basta colocar sobre la superficie del caldo una capa de unos 3 centímetros de aceite, vaselina o parafina líquida, que no disolviendo el oxigeno constituyen un gran elemento aislador entre la atmósfera y el medio privado de él por la ebullición. Cuando se trata de medios sólidos, como la penetración del oxígeno se hace difícilmente, llenando con el medio dos tercios del tubo de cultivo, al cabo de los días necesarios para el desarrollo del microorganismo no ha penetrado más que hasta 1 o 2 centímetros por debajo de la superficie, quedando el resto de la masa libre de oxígeno y perfectamente dispuesta para el crecimiento de los microbios, por muy anaerobios que sean.

Eliminación por el vacío. — Los anteriores procedimientos sólo pueden tener aplicación a los cultivos en profundidad, sea en medios sólidos o líquidos; para los cultivos en superficie se necesita quitar el oxígeno del aire contenido en la vasija de cultivo y cerrar ésta de modo que no vuelva a penetrar en todo el tiempo que dure la incubación.

Este procedimiento exige el empleo de tubos, matraces y, en general, vasijas especiales que tengan un tubo para ponerlos en comunicación con el aparato que verifica el vacío. Después de verificadas las siembras, se cierra herméticamente la boca a la lámpara, se verifica el vacío por medio de la trompa de agua o la bomba de mercurio y se cierra el tubo del vacío a la lámpara también. Además de necesitar un material especial, resulta muy engorroso y muy difícil de practicar, pues si tenemos en cuenta que no conseguimos el vacío absoluto y lo más que hacemos es diluir más o menos el aire contenido, se comprenderá que en muchas ocasiones quedará todavía la suficiente cantidad de oxígeno para dificultar el desarrollo de los anaerobios en la superficie.

También se pueden obtener los cultivos en anaerobiosis por medio del vacío, con tubos y matraces ordinarios, colocando las siembras en campanas cerradas herméticamente y hasta en estufas (fig. 42), en las que se hace el vacío.

Sustitución del oxígeno por gases inertes. — Requiere vasijas especiales, provistas de dos tubuladuras para la extracción del oxígeno y circulación del gas inerte, una lateralmente y otra que atraviesa el tapón de goma o las dos laterales, además de la boca. El gas generalmente empleado es el hidrógeno producido por la granalla de cinc y el ácido sulfúrico en el apara-

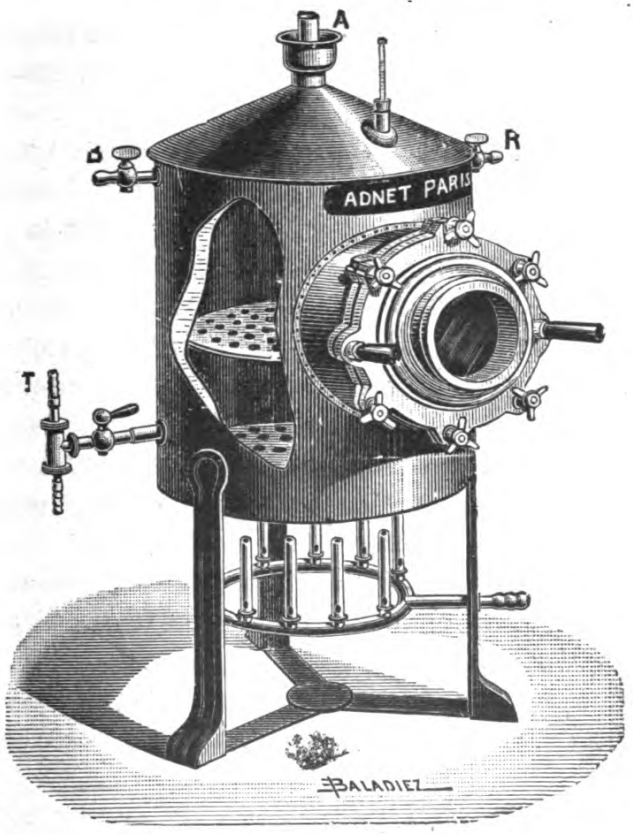


Fig. 42. — Estufa para cultivos en el vacío.

to clásico de Kipp, con todos sus accesorios; una vez verificada la siembra, se pone en comunicación uno de los tubos con la trompa de agua y la otra con el generador del gas, de modo que al mismo tiempo que se extrae por aspiración el aire contenido en el tubo o matraz, va penetrando hidrógeno; manteniendo esta circulación bastante tiempo, el aire es reemplazado casi completamente por el hidrógeno, ardiendo con su aspecto característico al salir por un tubo afilado; para evitar

la explosión, no se haga la prueba hasta que arda sin explotar el gas recogido en un tubo de ensayo invertido. En llegando a este punto, sepárense los tubos de goma y ciérrense con tapones de goma y plastelina o a la lámpara, los orificios de entrada de los tubos, antes de llevarlos a la estufa, para impedir que el aire entre de nuevo.

Este procedimiento, aunque presenta el peligro de las explosiones y requiere, como hemos indicado, utensilios especiales, es bastante usado en los Laboratorios por ser mucho más cómodo que el anterior.

Absorción del oxígeno por el ácido pirogálico. — Uno de los más empleados por no exigir aparatos especiales. Basta colocar los tubos o matraces sembrados en otras vasijas más grandes, cerradas con tapón de goma o cristal y plastelina, en cuyo fondo se halla depositado en ácido pirogálico sólo, mezclado con arena o sobre una capa de algodón, que sirva de soporte, e inmediatamente antes del cierre se añade lejía de potasa. Según el cálculo de Buchner, para cada 100 cent. cúb. de aire se necesita 1 gramo de ácido pirogálico, en substancia o disuelto en 2 o 3 cent. cúb. de agua y 10 cent. cúb. de una lejía de potasa al 1'5 por 100.

Los cultivos en tubos pueden ser mantenidos aisladamente, según Buchner, poniéndolos dentro de otros más anchos y largos, con una varilla de vidrio en su parte inferior, que impide el que el tubo contenido llegue a tocar la mezcla absorbente de pirogálico y potasa cerrados con tapones de goma y plastelina.

CAPÍTULO III

EXPERIMENTACIÓN EN LOS ANIMALES

Siendo nuestro objeto el estudio de los microbios patógenos, la experimentación en los animales constituye uno de los principales elementos de estudio, ya que en el hombre, por razones sencillísimas de comprender, raramente la podemos realizar.

1. Inoculación.

Consiste en la introducción del organismo del animal objeto de la experimentación, de la cantidad necesaria de un cultivo o producto patológico para provocar la enfermedad o las reacciones defensivas apropiadas.

Animales de experimentación. — Los animales corrientemente utilizados son los llamados de laboratorio: conejillo de Indias, conejo común, ratón blanco, rata blanca, ratones y ratas grises, gallinas, palomas y ranas. Con frecuencia empléanse también otros menos manejables, como el gato y perro, o muy costosos, como la oveja, cabra, ternera, vaca, asno, caballo, mono, etc., etc.

En los grandes laboratorios casi todos los animales son criados en el propio laboratorio, con lo que se evitan muchas enfermedades, a veces epidemias mortíferas en extremo, introducidas por los animales adquiridos en el mercado, de procedencias distintas. En los laboratorios más modestos la necesidad de adquirirlos en el mercado es ineludible; afortunadamente, se principian a establecer en nuestro país criadores de animales especialmente destinados a los laboratorios, de modo análogo a los existentes en el extranjero; pero mientras este comercio no haya alcanzado el debido desenvolvimiento, y aun después, bueno será recordar al investigador la conveniencia de mantener en observación, dentro del laboratorio, durante diez o quince días, los animales adquiridos, para separar los que, llegando enfermos, pueden alterar los resultados obtenidos y hasta contagiar a los demás.

Sujeción del animal durante la inoculación. — En general, se puede verificar sin aparatos especiales; aun los grandes animales pueden ser inoculados, valiéndose a lo más de algún ayudante práctico para sujetar al animal, apelando a los aparatos especiales solamente en los casos en que, por tratarse de substancias muy peligrosas (peste, tétanos, etc.), u operaciones algo complicadas (colocación de sacos de colodion en el peritoneo mediante laparotomía), es preciso evitar todo movimiento del animal.

La inoculación sin ayudantes se puede practicar fácilmente

en conejos y conejillos de Indias y aves, sujetando el animal entre las piernas, por la parte anterior del cuerpo, si la inoculación ha de hacerse en las patas traseras, o por la parte posterior, si ha de ser en la cabeza o parte anterior del cuerpo, claro es que procurando siempre no ejercer presiones que puedan dañar al animal. Los ratones y ratas blancas se pueden inocular sin ayudantes también, colocándolos debajo de una campana de cristal, dejando el rabo fuera.

Para la inoculación de los demás animales, por unas u otras razones, necesitaremos ayudantes, y aun en los anteriores trabajaremos con más comodidad si los tenemos, no debiendo olvidar nunca que, aun tratándose de animales tan inofensivos como el conejo, en el momento de cogerlos pueden producirnos fuertes arañazos con las patas, para agarrarlos siempre por la piel del dorso.

Los aparatos de contención más sencillos y útiles son simples bandejas de cinc fenestradas o con ganchos en sus ángulos para atar los lazos que sujetan al animal; pueden utilizarse igualmente los complicados aparatos de contención empleados en los laboratorios de fisiología de Cowl, Latapie, etc.; pero siendo suficientes las bandejas indicadas, se desinfectan con mucha mayor facilidad, y esto constituye una gran ventaja en las investigaciones bacteriológicas, todas más o menos peligrosas.

Preparación del campo operatorio. — Cubiertos de pelos o plumas en casi toda la superficie del cuerpo, deberá preceder a las inoculaciones, por regla general, la eliminación de tales apéndices cutáneos, para que la asepsia y manipulación sea eficaz. En los animales de pelo será suficiente, en la mayor parte de los casos, el corte a punta de tijera o con una máquina del 0, teniendo gran cuidado, sobre todo en los animales de piel muy movible, como el conejo, de no arrastrar la piel con el aparato; pero si se quiere una limpieza mayor, se puede apelar al rasurado o a la depilación por medio de los sulfuros. Para esto, con sulfuro de calcio o bario y creta a partes iguales y una pequeña cantidad de agua, se forma una lechada espesa que se extiende por toda la superficie del campo operatorio; al cabo de unos minutos, con algodón se hace la prueba de arrastrar el pelo y, si sale con facilidad, se continúa la opera-

ción, aguardando en caso contrario algunos minutos más, hasta que el desprendimiento sea fácil; después se lava cuidadosamente toda la superficie para eliminar el resto del sulfuro, que podría dañar la piel. En algunos animales la piel es tan sensible, que con frecuencia ésta se necrosa; pero será fácil evitar tal percance, determinando por algunos tanteos las cantidades que deben mezclarse de creta y sulfuro para que la acción se mantenga en el límite debido; y en todo caso, una rigurosa vigilancia del momento en que debe suspenderse la acción por haber alcanzado el límite, nos ahorrará toda complicación.

En los animales de pluma lo mejor será arrancar las plumas de la región correspondiente.

La asepsia del campo operatorio se hace lavando primero fuertemente con jabón, quitando éste por sucesivos lavados con agua y lavando después con sublimado al 1 por 1.000, y mejor con alcohol o con los dos.

Inoculación cutánea. — Es poco frecuente porque la barrera cutánea constituye un serio obstáculo para la penetración de la mayor parte de los microbios, pero en algunas ocasiones, como en el diagnóstico de productos pestosos, presta excelentes servicios. Basta frotar el material que se desea inocular sobre la piel, privada de sus capas más superficiales, en algunos puntos, por el rasurado, para que la inoculación tenga lugar; cuando más necesitaremos raspar la piel de modo que no salga sangre, con un escarificador.

En la inoculación cutánea, tendremos un especial cuidado en que no quede en la superficie del campo que hemos de utilizar para la inoculación, ningún antiséptico que pudiera invalidarla, debiendo siempre, en último término, lavar abundantemente con agua esterilizada, para alejar todo vestigio de antiséptico, o si se esteriliza con alcohol, debe esperarse hasta que se haya evaporado por completo.

Inoculación subcutánea. — Aunque siempre el material se introduce en las mallas del tejido conjuntivo subcutáneo, la técnica es algo distinta, según se trate de material sólido o líquido.

Para el *material sólido* utilizaremos bolsas subcutáneas, que se forman haciendo con las tijeras un pequeño ojal en la

piel e introduciendo por debajo de ésta una sonda acanalada, en la dirección de la superficie, una rama de la tijera roma u otro objeto semejante, hasta formar una pequeña bolsa en la que se introduce el material que deseamos inocular de esta manera. Para evitar que lo inoculado se salga por las maniobras que pueda realizar el animal, y sobre todo por las compresiones, será conveniente formar las bolsitas en sitios algo protejidos; en el conejillo de Indias, en la piel del vientre o pecho; en el conejo común, en la cara interna de la oreja o del muslo; en los ratones, en la base de la cola, etc., sitios en que además el tejido conectivo subcutáneo es más laxo.

Las *materias líquidas* se inoculan subcutáneamente mediante las jeringas de inyecciones, siendo numerosísimos los modelos existentes, y todos igualmente útiles con tal que sean fácilmente esterilizables y duraderos. Cogiendo un pliegue de la piel esterilizada con el pulgar y el índice de la mano izquierda, se introduce la aguja de la jeringa en la base del pliegue tangencialmente hasta que la punta se mueva fácilmente dentro del conectivo subcutáneo; se inyecta la cantidad necesaria de líquido y se extrae rápidamente la aguja, bastando, por regla general, un ligero movimiento de la piel para que, destruyéndose el paralelismo de las capas, se cierre el orificio de salida y quede retenido el líquido; si por excesiva tensión del líquido o por otras razones se saliera por la puntura, se puede ocluir ésta con un poco de algodón empapado en colodión.

Los sitios preferibles para las inoculaciones, son los mencionados para la formación de las bolsas.

Inoculación intramuscular. — Se verifica de modo semejante a la anterior, de modo que la aguja penetre en las grandes masas musculares.

Inoculación intraperitoneal. — El animal debe ser sujetado en una bandeja o mantenido por un ayudante, cogiendo con una mano las patas delanteras y con la otra las traseras; preparado debidamente el campo operatorio, con la tijera se hace un minúsculo ojal en la piel y con la jeringa, armada de una cánula roma, se atraviesa la capa muscular y el peritoneo, y cuando la punta se mueve libremente en la cavidad peritoneal, se verifica la inyección; una vez practicada, se retira rápidamente la jeringa al mismo tiempo que el ayudante junta las dos ma-

nos para disminuir la tensión del vientre e impedir que el líquido inyectado se salga.

La inoculación intraperitoneal con substancias sólidas, se verificará por medio de un ojal abierto en la pared abdominal, con las precauciones de una verdadera laparotomía, que será cerrada con una sutura por planos.

Inoculación intrapleural. — Se verifica después de haber puesto al descubierto la pleura en un espacio intercostal.

Inoculación subdural. — Muy frecuente en el conejo para la inoculación de la rabia. Sujeto el animal y apoyada fuertemente la cabeza sobre la bandeja, se hace una incisión longitudinal, en la línea media de la región frontal de 2 a 3 centímetros; disecados los bordes de la incisión y raspado el perióstio, con un trócar pequeño se hace un orificio en el cráneo 2 o 3 milímetros por fuera de la línea media, a fin de huir del seno longitudinal, y evitar la hemorragia consiguiente; con la jeringa provista de una aguja acodada, se atraviesa la dura madre, que está a la vista, y se inyecta la cantidad necesaria de líquido, generalmente unas cuantas gotas; sutúrese la piel después de cohibida la pequeña hemorragia.

Inoculación intraocular. — Se puede verificar a través de una incisión del borde escleral, como en la iridectomía, o sujetando el globo del ojo con pinzas de fijación y pinchando tangencialmente la córnea hasta penetrar en la cámara anterior, siempre en anestesia local mediante la cocaína.

Inoculación intravascular. — Generalmente se practica en una vena superficial, de ordinario la yugular externa, puesta al descubierto por una incisión de la piel, introduciendo una cánula de bisel corto en sentido periférico y suturando la piel una vez extraída la cánula. En el conejo practícanse en la vena marginal externa de la oreja, pues la interna es más pequeña y la media es muy móvil, deslizándose cuando se intenta meter la aguja; la inyección se verifica por la cara más peluda de la oreja, procurando que se ponga bien de manifiesto por medio de golpes repetidos o envolviéndola unos minutos en algodón empapado en éter, cloroformo, alcohol u otros líquidos irritantes; introdúzcase la cánula de bisel corto en la vena tangencialmente, por lo menos 1 centímetro, e inyéctese; si la cánula está mal colocada, el líquido se acumulará en el co-

nectivo perivascular y se formará un abultamiento, y en este caso corríjase la posición hasta que el líquido penetre con seguridad en el vaso. En las aves utilízase la vena axilar, muy perceptible en la raíz del ala. Evítese la penetración del aire en las venas.

Inoculación por las vías digestivas. — Puede verificarse mezclando el material infectante con un alimento apropiado para que el animal lo tome por sí mismo; puede depositarse directamente en el estómago, abriendo la boca con un taco de madera introducido por detrás de los dientes anteriores y colocando una sonda que llegue al estómago para hacer caer los líquidos, o depositando las materias directamente en la faringe si se trata de alimentos sólidos; finalmente, podemos valernos del intestino, introduciendo las substancias por medio de sondas. También se pueden emplear caminos artificialmente preparados, como las fístulas empleadas en fisiología, o verdaderas intervenciones quirúrgicas, como las practicadas, con no poca frecuencia, para infectar de modo distinto la vesícula biliar.

Inoculación por las vías respiratorias. — Depositando la materia infectante en la tráquea por medio de sondas, inyectando en la tráquea mediante una jeringa introducida entre dos anillos traqueales, o por inhalación, haciendo que el animal respire dentro de atmósferas cerradas en que se pulveriza la substancia que queremos inocular.

Dosificación de la cantidad de materia infectante inoculada. — Constituye un dato de muchísima importancia y, sin embargo, generalmente no puede determinarse sino dentro de límites muy lejanos, utilizando procedimientos arbitrarios. Si la materia es un producto natural, orina, heces, etc., sólo podremos medir la cantidad introducida del producto o de una dilución; si infectamos con el mismo microbio extraído de los cultivos, podemos obrar con alguna mayor aproximación, pero sin llegar a la exactitud. Cuando se trata de cultivos en medios líquidos, se suele medir por la cantidad de cultivo introducida, siempre que tengan el mismo tiempo de crecimiento, a la misma temperatura y en igualdad de las demás condiciones; en los cultivos sólidos se mide con frecuencia por el número de asas de platino que se han arrastrado de la superficie para formar la

dilución que se inocula y la cantidad inoculada de ésta, fabricándose asas que se llaman normales, que recogen, estando completamente llenas, 2 miligramos de substancia.

Fácilmente se comprende que los procedimientos que acabamos de describir son demasiado groseros tratándose de objetos microscópicos que, aun en los cultivos, están mezclados con grandes cantidades de otras substancias mal conocidas, tendiéndose en la actualidad a sustituirlos por otros más racionales, aunque por ahora no sean mucho más exactos. Estos procedimientos consisten en la cuenta directa del número de microbios contenidos en el cultivo líquido o en la dilución que hemos hecho con el cultivo sólido en caldo o en solución salina isotónica; esta cuenta se practica con el hematímetro del mismo modo que si intentáramos contar hematíes, o por comparación, mezclando cantidades de sangre normal y la dilución infectante, determinando en el hematímetro o en preparaciones teñidas la relación existente entre el número de hematíes y microbios, para deducir el número absoluto de éstos por el de aquéllos.

Los procedimientos de contar los microbios que parecen mucho más exactos presentan todavía errores groseros, y como son bastante engorrosos son sustituídos de ordinario por la comparación de la turbidez de los cultivos en caldo o de las diluciones hechas con los cultivos en medios sólidos, con diluciones de títulos determinados, que se conservan más o menos tiempo y sirven de término de comparación.

2. Observación de los animales inoculados.

Una vez inoculado el animal debe ser aislado de los demás, colocándolos si son pequeños, ratones y ratas, en cilindros de cristal, cubiertos con rejilla metálica, y los demás en jaulas de hierro y tela metálica de dimensiones apropiadas. En cada cilindro o jaula debe ponerse una etiqueta en que se haga constar las señas del animal, siendo preferible con este objeto el que tengan una silueta donde señalar las partes coloreadas de la piel con los colores respectivos; también se pueden hacer

señales en las orejas de los conejos o en el cuerpo, con colores de anilina o por medio de cortes de pelo de las orejas, o sujetándoles números de plomo en diferentes partes del cuerpo, preferentemente en las orejas para los conejos y las patas en las aves. También se hará constar el sexo, el peso en el momento de verificar la inoculación y cuantas observaciones se crean pertinentes.

Todos los días siguientes al de la inoculación será detenidamente observado, tomando nota de las modificaciones que se adviertan en el estado general, adelgazamiento, pelo erizado, excitación o, por el contrario, abatimiento o postración, intensidad del apetito, aspecto y cantidad de las deposiciones, aparición de vómitos, tos, temblores, convulsiones, parálisis y otros fenómenos patológicos. Será pesado con el mayor cuidado y tomada la temperatura rectal con un termómetro de máxima, debiendo tenerse en cuenta que ésta oscila bastante dentro de la misma especie animal, en el conejo entre 38,3 y 40°, en el conejillo de Indias entre 37,3 y 39'5°, en el perro entre 37'5 y 39'9° y en la gallina y la paloma entre 41 y 42'5°. También anotaremos las alteraciones que se hayan presentado en el sitio de la inoculación, de forma, color, consistencia, replección vascular, reacción ganglionar, etc.

La observación de los animales inoculados debe seguirse hasta su muerte o hasta su completa reposición, debiéndose tener en cuenta en este último caso, la posible existencia de lesiones no perceptibles por simple examen del animal y la conveniencia de sacrificar y autopsiar aun a los animales aparentemente sanos.

3. Autopsia.

Todo animal muerto en un Laboratorio debe ser objeto de una autopsia detenidísima, inmediatamente después de la muerte, o lo más pronto que sea posible, colocando el cadáver entretanto en un sitio frío. Para verificarla se sujeta el cadáver con el vientre hacia arriba sobre una bandeja de las empleadas para las inoculaciones por medio de lazos o sobre una tabla con clavos o agujas fuertes, que se atan o clavan respectivamente en las extremidades extendidas en cruz; en esta po-

sición se lava la superficie del cuerpo con una disolución de sublimado u otro antiséptico, con el doble objeto de desinfectar e impedir en lo posible, que los pelos se desprendan durante la autopsia; el cresol reúne a estas dos la ventaja de ahuyentar los insectos con su mal olor. Los instrumentos, esterilizados por ebullición, salvo los de corte, que lo serán por inmersión en ácido fénico al 4 por 100 y mejor en alcohol, se dispondrán en una bandeja al alcance de la mano, volviéndolos a dejar en ella cuando no sean usados, después de flamearlos o de enjuagarlos en una disolución de cresol, y esterilizándolos profundamente al terminar la autopsia del mismo modo que antes de empezar. Claro es que tienen aplicación a la autopsia de los animales del laboratorio la mayor parte de las reglas enunciadas al tratar de la autopsia humana, y todo bacteriólogo deberá haber recibido la educación anatomo-patológica conveniente para realizar la autopsia en la debida forma, observar las alteraciones que se presenten con exactitud e interpretar bien las lesiones.

Todo dispuesto, según acabamos de indicar, se comienza por observar detenidamente el sitio de la inoculación, y si es preciso, se verifican siembras después de incindir al través de un espacio cauterizado con una espátula caliente. Se incinde la piel en la línea media desde el hocico hasta el pubis y se continúa la incisión lateralmente hasta la raiz de los miembros, examinando con la mayor atención el estado de los ganglios del cuello, axilas e ingles y haciendo siembras si fueran necesarias; se abre un ojal en la parte media inferior de la pared del vientre, y después de observar si sale líquido, su aspecto, y hacer siembras si son oportunas, se introduce una tijera o un escalpelo con el filo hacia arriba y se secciona toda la pared en la línea media de abajo a arriba hasta llegar al diafragma, aumentando el campo por otra sección transversal en cada lado; a continuación se examinan todas las vísceras abdominales y se verifican cuantas siembras se crean convenientes. En seguida se cortan con las tijeras las costillas a cada lado del esternón, se tira del apéndice xifoides hacia arriba al mismo tiempo que se seccionan las inserciones correspondientes del diafragma y se desprende la pared anterior del torax movilizada de esta manera, cortando las inserciones de los músculos

del cuello en el esternón; si necesitamos sembrar del líquido pleural, lo haremos antes de abrir el pecho, al través de un espacio intercostal, pero del pericardio sembraremos después de separada la pared; examínense a continuación los órganos torácicos y siémbrese de ellos comenzando por hacerlo con la sangre del corazón a través de la pared del ventrículo o de la aurícula cauterizada. Examínense detenidamente los ganglios abdominales y torácicos, y, finalmente, el contenido del intestino practicando las siembras oportunas.

Los órganos nerviosos pueden ser examinados antes o después que los demás, debiendo tenerse en cuenta para decidir la importancia de las siembras que hayamos de practicar para aislar el germen; su apertura en los animales del laboratorio se practica con unas tijeras fuertes, penetrando en la cavidad craneal por encima de las órbitas, seccionando todo el cráneo por una línea semejante a la descrita en la autopsia humana y tirando del cráneo desprendido para cortar todas sus adherencias; después se dan dos cortes profundos con las tijeras a cada lado del cerebelo para seccionar la tienda osificada, en muchos de estos animales, y se acaba de descubrir el encéfalo; a continuación, con las mismas tijeras y gran precaución, para no magullar la médula, se cortan las láminas, sucesivamente a un lado y otro de la columna vertebral, hasta descubrir la médula por completo; examínense bien todos estos órganos y practíquense las siembras convenientes.

De cada órgano se separan las porciones necesarias para el examen histopatológico, y si las lesiones fueran dignas de ser conservadas, se pondrán los órganos y hasta los animales enteros, convenientemente preparados, en líquido de Kaiserling.

Si, al verificar las siembras, tuviéramos la sospecha de la escasa cantidad de gérmenes, frotaremos trocitos de órganos sobre la superficie de los medios de cultivo sólidos o depositaremos en los medios líquidos pedacitos de órganos recogidos con las mayores precauciones asépticas para evitar las posibles y fáciles contaminaciones. En ocasiones será necesario el aplastamiento de nódulos para obtener la semilla, como ocurre en la tuberculosis.

Después de verificada la autopsia, el animal será destruído, introduciéndole en una vasija con ácido sulfúrico, y mejor por

medio de un horno crematorio, pero también puede ser enterrado a continuación de una desinfección de una a cuatro horas en agua hirviendo. La bandeja y todos los demás utensilios empleados serán igualmente desinfectados con el mayor esmero, y la misma precaución tendrá el operador con sus manos y con cuantos objetos hayan podido contaminarse.

CAPÍTULO IV

AISLAMIENTO DE GÉRMENES

Aislar un germen es separarlo de los demás que le acompañan hasta tenerlo en cultivo puro. Los procedimientos utilizados en bacteriología con este objeto pueden distribuirse en dos grandes grupos, formado el primero por los que se basan en la repartición mecánica de los gérmenes, aplicables a todos los microbios, llamados generales o mecánicos por los bacteriólogos, y el segundo por los que utilizan determinadas circunstancias de la vida de los mismos microbios para facilitar su desarrollo a la par que dificultan el de los demás y, por consiguiente, aplicable solamente a microbios determinados, conocidos con la designación de especiales o biológicos.

I. — Procedimientos mecánicos o generales

1. Por dilución.

Es el procedimiento más antiguo de todos, ideado por Lister, y sólo mencionado en la actualidad como recuerdo, ya que, aisladamente, rara vez se usa en los laboratorios. Se funda en que si los gérmenes contenidos en una gota se diluyen en 10 cent. cúb. de líquido estéril y una gota de esta dilución primera la volvemos a diluir en otros 10 cent. cúb., y así sucesivamente, llegaremos a una dilución tal, que cada gota llevará

cuando más un germen, y repartiendo varias gotas de esta dilución final en tubos con medios de cultivos líquidos, obtendremos cultivos puros de los microbios que deseábamos. Esto ofrece en la práctica una gran cantidad de inconvenientes; los microbios no suelen estar tan perfectamente repartidos en los medios de cultivo, que por muchas diluciones que hagamos siempre obtengamos cultivos puros; no todos los microbios se cultivan bien en medios líquidos; los cultivos en caldo no son, por regla general, suficientemente característicos para juzgar del estado de pureza sin apelar al microscopio y a las resiembras; la cantidad de material, trabajo y tiempo que se necesitan son demasiado grandes.

2. Por diseminación.

Este procedimiento, ideado por Koch al mismo tiempo que introdujo el empleo en los medios sólidos en la técnica bacteriológica, es el empleado corrientemente en todos los laboratorios. Consiste en la repartición de los gérmenes contenidos en una mínima porción del material impuro, en una gran extensión de un medio de cultivo sólido, debidamente desecado, para que las colonias desenvueltas por cada uno de los microbios en ella contenidos aparezcan bien separadas, apreciándose sus caracteres y pudiendo fácilmente tomar material de las que buscamos para las resiembras. Para conseguir este objeto se hace preciso que entre el número de gérmenes existentes en el material impuro y la extensión en que los hemos de distribuir haya una relación determinada, y como ésta es difícil de determinar de antemano, conviene utilizar siempre un exceso de extensión, lo que conduciría al empleo de extensiones difíciles de manejar, si no se asociara al principio de la extensión el de la dilución, de diferentes maneras, según vamos a ver.

Los medios sólidos de cultivo utilizados en el procedimiento de diseminación pueden distribuirse en tubos, pero con más frecuencia se emplean con este objeto las placas de Petri, que son cajas circulares de cristal formadas por la superposición invertida de sus dos mitades, una de las cuales de diámetro un

poco superior abraza a la otra. Las hay de diámetros distintos, desde 5 a 6 centímetros hasta 22 o 24, siendo las más usadas las de 10 a 12. También se diferencian por la altura del reborde que determina la altura de la capacidad interior, ordinariamente de 1 a 2 centímetros.

Diseminación en masa. — 1.° Liquídense en baño-maría tres tubos de gelatina o agar, que contengan la cantidad del medio suficiente para formar en la placa de Petri una capa de medio centímetro aproximadamente, y manténganse fundidos a 40° si se trata del agar o a temperatura inferior si trabajamos con la gelatina.

2.° Siémbrese en el primero un asa del material impuro e inclinando y moviendo el tubo de maneras diversas, pero huyendo siempre de agitar para que no se formen burbujas, se hace que se reparta bien en el medio el material sembrado.

3.° Siémbrese en el tubo segundo un asa del primero, póngase el primero en el baño maría y muévase el segundo para que se reparta por igual.

4.° Con el tubo segundo siémbrese el tercero del mismo modo.

5.° Viértase el contenido de cada tubo en una placa de Petri, muévase suavemente para que se extienda bien el contenido y colóquense las placas horizontalmente en un sitio frío para que se solidifiquen rápidamente.

6.° Llévense las placas con las indicaciones precisas, en etiquetas o con lápiz, a la estufa de 22°, con la tapadera hacia arriba si son de gelatina, y a la de 37° (o a otra, según los casos) con la tapadera hacia abajo, para que se acumule allí el agua de condensación, si son de gelosa.

Si se sospecha que el material es poco rico en gérmenes se pueden emplear en la siembra del primer tubo, dos, tres o más asas de material, y en las sucesivas igual número de las siembras anteriores; si por el contrario tiene muchos, en vez de sembrar tres tubos del modo indicado, sembraremos cuatro o más, utilizando todos los tubos o prescindiendo del primero que sirve exclusivamente para la dilución y puede hacerse con solución salina.

El objeto del empleo de las placas de Petri es extender el medio sobre una gran superficie para que las colonias aparez-

can bien separadas, pero si se carece de las placas en un momento dado, puede extenderse el medio en los mismos tubos siguiendo el ejemplo de Esmarch, es decir, solidificando la gelatina o la gelosa después de sembrados, haciendo girar e inclinando el tubo en las más variadas direcciones para que el medio se solidifique sobre toda la pared del tubo en forma de una capa uniforme y lo más delgada posible. En cada tubo se pondrá 1 cent. cúb. del medio.

En los aislamientos por diseminación en masa, la gelatina presenta colonias mucho más características que el agar, pero en cambio ofrece el inconveniente de la baja temperatura a que han de ser cultivados los microbios, determinando un retardo en el crecimiento e imposibilitando por completo el de algunos gérmenes; la rapidez de su liquefacción por muchos microbios, constituye en muchas ocasiones seria dificultad.

Diseminación en superficie con dilución previa. — 1.° Prepárense las placas de Petri extendiendo el medio líquido y solidificándolo para que se forme una capa de 4 a 5 milímetros, colocándolas en sitio fresco y horizontal.

2.° Si son de gelosa, el material más frecuentemente usado en este procedimiento, es necesario después de la solidificación quitar el agua de condensación que haya podido extenderse en la superficie, poniéndolas entreabiertas en la estufa de 37° durante media a una hora.

3.° Hágase una primera dilución poniendo una gota o asa del material en 10 cent. cúb. de solución salina isotónica esterilizada; agítese para que se reparta con uniformidad y póngase una gota o asa de ella en otros 10 cent. cúb. de la solución salina, formando la segunda dilución y de esta manera la tercera y cuantas sean precisas, en relación con la riqueza en gérmenes del material que se ha de sembrar.

4.° Póngase en la superficie de una primera placa una gota o asa de la primera dilución, y con un triángulo de platino o con una varilla de cristal acodada, de modo que la rama corta sea de dimensión inferior al diámetro de la placa, frótese la superficie suavemente hasta que el líquido de la gota se haya esparcido por toda ella. Rotúlese la placa y hágase lo mismo con la segunda dilución en otra placa y sucesivamente con las demás hasta sembrar de todas. Si el material es poco abun-

dante en gérmenes debe extenderse en la primera placa una gota del material sin diluir, no llegando más que a la segunda o tercera diluciones, pero si por el contrario es demasiado abundante se puede prescindir hasta de las primeras diluciones, quedando siempre a la discreción del operador el juzgar de estas condiciones.

5.° Llévense las placas a la estufa correspondiente poniéndolas con la tapadera hacia abajo.

Diseminación en superficie con agotamiento. — Puede verificarse en tubos o en placas preparadas de antemano como hemos dicho en el procedimiento anterior; tómese con el asa de platino una pequeña porción del material impuro, frótese con ella de modo que no se rompa el medio, la superficie de una placa o tubo, y sin tocar de nuevo el material, frótese una segunda placa o tubo, una tercera y cuantas juzguemos precisas para llegar a sembrar con escasísimos gérmenes. En el primer tubo o placa aparecerá un número incontable de colonias, casi un nublado, si el material tenía bastantes gérmenes, en la segunda siembra el instrumento llevará menos gérmenes y en las sucesivas llegan a tan poco número, que solamente se ve alguna colonia.

Este procedimiento se puede practicar también empleando una sola placa de gran superficie, haciendo con el asa contaminada una estría continua que la recorra toda en forma de espiral.

Los aislamientos por diseminación superficial con dilución o por agotamiento se pueden verificar del mismo modo sobre las mezclas de agar con otros medios, sobre suero sanguíneo o huevo endurecido, etc.

Investigación de las placas. — Después de una incubación variable de algunas horas a varios días, según la rapidez del crecimiento del microorganismo que pretendemos aislar, se hace el estudio detenido de las colonias que se han formado. Este estudio se hace primeramente a simple vista, indagando en aquellas placas en que las colonias están suficientemente separadas, si se muestran algunas que correspondan por sus caracteres, tamaño, color, transparencia u opacidad, aspecto, elevación sobre el terreno, etc., a las del microbio en cuestión. A continuación debe hacerse el examen microscópico, colo-

cando la placa con la tapadera hacia abajo sobre la platina del microscopio, iluminando con el espejo sin condensador, diafragmando convenientemente y observando con un objetivo de poco aumento; si la opacidad del medio o la liquefacción, tratándose de la gelatina, dificultara o impidiera la observación al través del medio, se pondrá la placa sobre la platina con el medio hacia abajo, sin tapadera, y se hará la observación iluminando al través o superficialmente. Gracias a esta observación microscópica, de la que no debemos prescindir en modo alguno, apreciaremos una porción de datos estructurales de las colonias, que nos ayudarán muchísimo en la identificación de los microbios; apreciaremos si las colonias que nos interesan, y hemos señalado en el examen macroscópico, están impurificadas por otras inapreciables a simple vista, y en muchos casos veremos las colonias que buscamos en el comienzo de su desarrollo, cuando pasarían desapercibidas por completo si nos fiáramos exclusivamente de la observación macroscópica, permitiéndonos aislar el germen que buscamos con mucha mayor rapidez.

A medida que verificamos los exámenes macro y microscópico, iremos señalando o circunscribiendo con un trazo las colonias que consideremos más apropiadas para el aislamiento del germen; inmediatamente practicaremos con ellas las indagaciones microscópicas que describiremos al ocuparnos de la identificación de gérmenes; y tan pronto como hayamos llegado a la convicción de que sean o puedan ser del microbio que buscamos, practicaremos con ellas las resiembras que consideremos oportunas en los medios más apropiados.

Si por haber resultado demasiado próximas las colonias aun en las últimas placas, o por otras razones, supusiéramos que el germen no está suficientemente aislado, practicaremos nuevos aislamientos por diseminación con el material de las colonias más características. Cuando a pesar de la investigación más escrupulosa, tanto macro como microscópica, no hallemos colonias desenvueltas en el medio, sobre todo haciendo la observación en las primeras horas, podremos apelar a las preparaciones por *impresión*. Para ello deposítese en la superficie del medio, en el sitio en que se colocó el material de siembra, o en el que sospechamos haber crecimiento, un cubre ob-

jetos bien limpio, flameado y frío; se le comprime sobre el medio y después se le separa, procurando que no deslice, conteniéndole por uno de los bordes al mismo tiempo que se levanta con una pinza por el opuesto, o levantándole a la vez por los dos bordes opuestos mediante unas pinzas mantenidas verticales; así que nos hemos apoderado del cubre se le seca rápidamente, se le fija a la llama, se le tiñe con cualquier color de anilina, se le monta sobre un porta y se le observa al microscopio, encontrando no sólo los microbios que comenzaban a desenvolverse, sino dispuestos en la agrupación que han de mostrar en la futura colonia, ofreciéndonos imágenes precisas de su estructura.

Aplicación de los procedimientos de diseminación a los anaerobios. Les son aplicables todos los procedimientos descritos, con sólo disponer las placas en anaerobiosis por alguno de los artificios descritos al ocuparnos del cultivo de los anaerobios, pero se utilizan de preferencia la absorción del oxígeno por ácido pirogálico, y la potasa y la sustitución del aire por el hidrógeno. Para el primer método colóquense las placas sembradas en un soporte debajo del cual se dispone un recipiente con la mezcla de ácido pirogálico y potasa en las proporciones indicadas, todo ello sobre una placa gruesa de cristal plano y esmerilado, y cubierto con una campana de cristal bien adaptable sobre la placa, y cementada con plastelina o una materia análoga. También se puede utilizar el artificio ideado por Lentz para convertir cada placa en una camarita aislada que permita la observación de los cultivos sin deshacer la anaerobiosis; consiste en el empleo de unos gruesos anillos de papel chupón, de un diámetro algo inferior al de

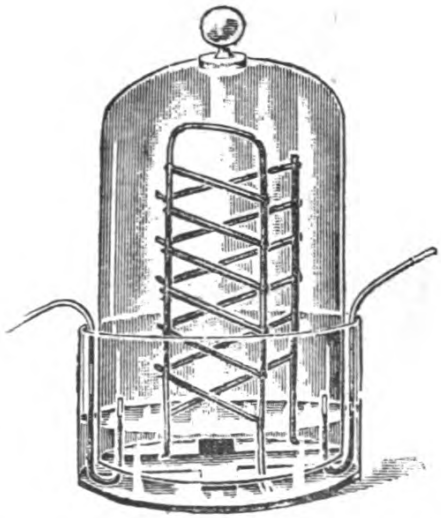


Fig. 43. — Aparato de Botkin para el aislamiento de los anaerobios en placas, en atmósfera de hidrógeno.

la placa corriente, con un orificio central que viene a tener un tercio del diámetro total y una altura tal que colocada debajo de la placa no toque al medio de cultivo, fabricados de manera que en el espesor del papel exista la cantidad de ácido pirogálico necesaria; sobre una placa plana de cristal de dimensiones algo superiores a las corrientes de Petri, se dispone uno de estos discos o anillos, se verifica la siembra de la placa de Petri e inmediatamente se vierte sobre el disco 15 cent. cúb. de una disolución de potasa al 1 por 100, cantidad necesaria para que se absorba el oxígeno, quedando todo el líquido absorbido por el papel; se invierte la placa de Petri, se coloca sin tapadera sobre la plana abrazando el anillo, y se cierra herméticamente con plastelina. La luz que pasa al través del hueco del anillo permite la observación de estas placas al microscopio.

Para el cultivo en atmósfera de hidrógeno se colocan las placas en un soporte bajo una campana de cristal, sobre un cristalizador con agua al través de la cual pasan los tubos conductores del gas, constituyendo lo que se llama cámara de Botkin (fig. 43).

II. — Procedimientos biológicos o especiales

1. Por mayor resistencia a la esterilización.

Esterilización de las formas vegetativas por el calor.—Si tenemos reunidos en un mismo material varios microbios no esporulados con uno solo esporulado y le sometemos a una temperatura de 80° o más durante varios minutos, todas las formas completamente desarrolladas, aun las del microbio que nos proponemos aislar, perecerán, resistiendo perfectamente los esporos. Pues bien; si llevamos estos esporos a continuación a un medio de cultivo apropiado, germinarán, encontrándonos con un cultivo puro del microbio que buscábamos. Este procedimiento no tendrá aplicación desde el momento en que existan en el medio dos bacterias esporuladas, a menos que los esporos sean muy desigualmente resistentes, en cuyo caso pudiera utilizarse para la separación una temperatura que fuera capaz de destruir no sólo las formas vegetativas sino los esporos de la especie menos resistente.

Este procedimiento, tan sencillo en apariencia, está erizado, en la práctica, de gran número de dificultades, siendo la principal la desigual resistencia de los esporos del mismo microbio, según una porción de condiciones, que obliga a proceder siempre por tanteos si se quiere tener la seguridad de acertar. Por esta razón no se emplearán más que materiales líquidos, pues en los sólidos se encuentran los esporos envueltos en cubiertas albuminosas producidas por la desecación, que cambian notablemente su resistencia al calor; además será preciso que la temperatura se reparta uniformemente para que la acción sea segura.

Para su aplicación se acostumbra a disponer el material líquido esporulado en pipetas Pasteur, cerrando los dos extremos por el calor; a continuación se colocan varias de estas pipetas cerradas en un baño-maría, a la temperatura conveniente según la resistencia de los esporos que deseamos conservar, generalmente a 80°; a los dos minutos de permanencia se extrae un tubo; a los cinco, otro, y así sucesivamente, de cinco en cinco minutos, hasta llegar a un tiempo que seguramente mate las formas vegetativas y los esporos. Con los tubos extraídos se verifican siembras en los medios apropiados; las de menos tiempo de acción pueden resultar impuras, y las de más tiempo, completamente estériles; pero las intermedias mostrarán en cultivo puro el microbio que buscamos. Por procedimiento semejante fué aislado el bacilo del tétanos de la tierra cultivada, por Kitasato.

Destrucción de los microbios menos resistentes por medio de substancias químicas. — A este grupo corresponde, por ejemplo, el aislamiento del bacilo tuberculoso, sembrando esputos y otros productos naturales en que, valiéndose de la antiformina u otros agentes, han sido destruídos los demás microbios que le acompañaban, procedimiento que describiremos cuando nos ocupemos especialmente del bacilo tuberculoso.

2. Por cultivo en condiciones eugenésicas para el microbio que se busca y disgenésicas para los demás.

Temperatura óptima. — No siendo igual la temperatura más favorable para el desarrollo de los distintos microbios y encontrándose reunidos varios que prefieren temperaturas bastante distintas, según a la temperatura que pongamos los cultivos, favoreceremos el desenvolvimiento de unos u otros. Este procedimiento fué preconizado hace años para separar el bacilo de Eberth de los productos contaminados, y sobre todo de las aguas, recomendando el cultivo de 42 a 46°; bien pronto se vió que esta temperatura favorecía especialmente al *bacterium coli,* y ha quedado en la bacteriología para el aislamiento del coli de las aguas cuando se utiliza este microbio como indicador de la contaminación. También se utiliza para el aislamiento de los termófilos que crecen, por encima de 50°, hasta 70°.

Presencia del oxígeno. — La presencia del oxígeno constituye un procedimiento de separación de las bacterias aerobias, como su ausencia para el de las anaerobias; pero entre los aerobios no es indiferente la cantidad de oxígeno en que se desarrolla el cultivo, existiendo aerobios que necesitan pequeñas cantidades y pueden vivir lo mismo en la superficie que en la profundidad de los medios líquidos, y otros, muy exigentes en cuanto a aquel elemento, que no crecen bien sino en la superficie. Esta propiedad es empleada en el aislamiento del vírgula del cólera, según veremos más adelante.

Medios de cultivo especiales. — Es el procedimiento más generalmente utilizado. Si la química de la nutrición de las bacterias fuera suficientemente conocida, podríamos fabricar medios de cultivo de condiciones tan precisas para el desarrollo de un microbio determinado, como actuamos ahora al ponerle a vegetar a una temperatura, demostrada la óptima después de repetidos ensayos; pero, como hemos dicho antes de ahora, no se han alcanzado todavía tales perfeccionamientos, y, por regla general, nos limitamos a determinar empíricamente cuáles son los medios más favorables dentro de los conocidos.

Estos medios, en unas ocasiones, ofrecen al microbio que

buscamos un terreno más favorable que a los demás, y así, por ejemplo, ocurre con el suero de Lœffler en el cultivo del bacilo diftérico, con el agar-sangre para el bacilo de Pfeiffer y los microbios hemoglobinófilos, con el agar-ascitis para meningococos y gonococos, el agua de peptona para el vírgula del cólera, etc.; pero en otras, el medio especial que formamos no es más favorable sino menos perjudicial para el microbio en cuestión; y de este modo, los medios especiales, con adición de ácidos, materias colorantes y antisépticos empleados para el aislamiento de algunos microbios, dificultan el desarrollo de todos los microbios, pero con mayor intensidad el de los que no nos interesan. Al hablar de cada microbio se detallarán estos medios especiales.

3. Por inoculación a los animales.

Los microbios patógenos, para los animales de laboratorio, nos ofrecen un procedimiento más, y con frecuencia más seguro que los demás, para su aislamiento de los materiales en que están mezclados con otros. Consiste en la inoculación al animal del material en que los microbios están mezclados; los no patógenos desaparecen, mientras que los que lo son, desde el sitio de la inoculación o, lo que es más favorable, penetrando en la sangre, provocan la enfermedad y la muerte, encontrándolos en cultivo puro en los sitios más apropiados para cada microbio en relación con las lesiones que producen. Aunque es muy posible el encuentro del microbio que buscamos en cultivo puro, según acabamos de indicar, no debe olvidarse que el material inoculado puede contener dos o más microbios patógenos y que muchos animales contienen microbios en su medio interno, para hacer las siembras por los procedimientos mecánicos de aislamiento antes descritos. De esta manera, en presencia de un material sospechoso de contener el bacilo del carbunco, material que con frecuencia contiene otros microbios esporulados, bastará en la mayor parte de los casos la inoculación al conejillo de Indias para provocar la enfermedad y aislar el germen con toda comodidad de la sangre. De idéntica manera podemos obrar en presencia de un esputo con pneumococos, inoculando un ratón, con los productos sospechosos de peste o muermo, inoculando al conejillo de Indias, etc.

4. Procedimientos mixtos.

Raramente son empleados los procedimientos descritos aisladamente; teniendo en cuenta su relatividad, se suman varios para conseguir con mayor seguridad el resultado apetecido, y con frecuencia se apela al procedimiento llamado por algunos de las *siembras fraccionadas,* con poca propiedad.

En general se asocia el procedimiento mecánico de la diseminación en todas sus maneras con los procedimientos especiales o biológicos de tal modo, que, después de aplicar el especial preferible en cada caso, las siembras deben ser verificadas por diseminación; pero, además, de ordinario se suman varios procedimientos biológicos, y así, para el aislamiento del vírgula del cólera, se siembra en agua de peptona, en vasijas de gran superficie, para que haya una gran cantidad de oxígeno y crezca en la superficie; para el bacilo de Eberth se hace el enriquecimiento en bilis, y después se verifica el aislamiento en medios con verde de malaquita, cristal violeta y otros antisépticos, etc.

El procedimiento de las siembras fraccionadas, que nosotros llamaríamos de *enriquecimiento progresivo,* consiste en la aplicación del procedimiento biológico elegido, tantas veces como sea preciso, antes de proceder al aislamiento por extensión para que el progresivo enriquecimiento del microbio que nos interesa sea tal, que el aislamiento resulte cosa fácil; las excelencias de este procedimiento las hemos visto repetidas veces en el aislamiento del vírgula del cólera en las aguas, obteniendo el microbio aislado, con mucha más facilidad y en mayor número, en las placas extendidas después de varias resiembras en agua de peptona que con las primeras.

CAPÍTULO V

IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROBIOS AISLADOS

Así que por la aplicación de los procedimientos anteriormente enunciados y cuantos se puedan describir en lo sucesivo, nos encontraremos en presencia de un microbio perfectamente aislado, en nuestros medios de cultivo, surge con toda naturalidad la necesidad de su identificación. ¿El microbio hallado es el que buscábamos precisamente? Si no buscábamos un microbio determinado, como ocurre cuando analizamos las bacterias contenidas en un medio, o cuando el microbio aislado no es el que buscábamos ¿corresponde a alguno de los microbios conocidos o estamos en presencia de una bacteria no descrita?

La respuesta a estas preguntas no es cosa sencilla en la mayor parte de los casos y desde luego podemos avanzar que no puede resultar en modo alguno de la comprobación de una o varias propiedades, necesitándose siempre el total estudio del germen, un conocimiento bastante completo de la bacteriología y un espíritu crítico bien cultivado. Sin embargo, no debe desanimarse el principiante por estas palabras; muchas investigaciones bacteriológicas y especialmente las anatomo patológicas, clínicas e higiénicas, dado el grado de perfeccionamiento que han alcanzado, se deslizan dentro de cauces bien marcados y conducen generalmente al hallazgo del germen que se busca, resultando relativamente fácil la identificación. No se olvide en todo momento que el bacteriólogo trabaja con seres vivos, inajustables a patrones rígidos y que por su rápida evolución están más predispuestos a cambios en todos sus caracteres que los demás; es decir, que el microbio aislado por nosotros en cada caso, aun perteneciendo a una especie determinada, tendrá algunas variantes que le proporcionarán fisionomía propia y no se desoriente si no se superpone exactamente sobre el cliché que de la especie se ha formado por las descripciones leídas, ni se apresure a dar patentes de identidad

sin un completo estudio, si quiere verse libre de repetidos fracasos.

Para llegar a la caracterización precisa de un microbio, necesitamos haber determinado con exactitud sus rasgos anatómicos, forma, tamaño, agrupación, estructura, apetencias para las materias colorantes y su fisiología especial en todos los órdenes de funciones con todas las acciones derivadas, entre las cuales, en las bacterias que nos ocupan, corresponde lugar preeminente a la acción patógena. Finalmente, desenvolviéndose esta acción patógena en otros seres que reaccionan de modos diversos en presencia de los distintos microbios, en estos modos de reaccionar, ha encontrado la bacteriología datos preciosos para su identificación.

De los métodos de estudio utilizados en la comprobación de los caracteres anatómicos de las bacterias, hemos dicho bastante al ocuparnos de la observación de los microbios y también hemos tratado con alguna extensión de la acción patógena en el capítulo referente a la experimentación de los animales, restándonos añadir, sobre una y otra materia, dentro de los límites de concisión en que se desenvuelve este manual, detalles que incluiremos en la técnica especial de cada microbio. En este capítulo dedicaremos nuestra atención exclusivamente a la descripción de los métodos preferibles para la demostración de ciertas actividades funcionales y de las reacciones biológicas empleadas de ordinario en el diagnóstico de los microbios.

I.—Métodos empleados en la demostración de algunas propiedades fisiológicas

Movilidad. — Véase lo dicho a propósito de la observación de los microbios en vivo, en gota pendiente y de la coloración de los flagelos.

Esporulación. — La presencia de esporos se comprueba por la simple observación en gota pendiente con mayor seguridad que de ninguna otra manera; la refringencia de la materia que forma el esporo es mucho más grande que la del cuerpo del bacilo, resaltando tanto, que además de comprobar la existencia de los esporos, podremos determinar su situación central o terminal, sus dimensiones con relación al diámetro del cuerpo, su

número y su estructura. La aparición, en las preparaciones coloreadas por los procedimientos corrientes, de espacios sin teñir, de forma y dimensiones aproximadas a las de los esporos, con una situación constante en relación con el cuerpo microbiano, puede hacernos presumir la existencia de esporos, pero no nos permite de ninguna manera afirmarla sin que los hayamos comprobado por los métodos de coloración expuestos en el lugar oportuno y por la observación en gota pendiente, pues es posible la existencia de vacuolas que los simulen, que no se tiñen por las coloraciones especiales y carecen de la refringencia de éstos en las gotas pendientes.

Tampoco aseguraremos que un microbio carece de esporulación solamente porque no se presente en unas cuantas observaciones; téngase en cuenta que la multiplicación por esporulación no se presenta de un modo constante aun en aquellos microbios que son capaces de formar esporos, siendo necesario examinarlos repetidamente en todos los medios de cultivo, en diferentes momentos de la evolución en cada medio, a distintas temperaturas, llevándolos, según el consejo de Heim, al agua destilada después de bien desarrollados en los medios más favorables para la vida del microbio o cultivándolos, de acuerdo con Buchner, en agar preparado con agua de carne sin peptona o en patata. Finalmente, si a pesar de todas las precauciones indicadas no llegamos a desvanecer nuestras dudas, el estudio de la resistencia del germen a los distintos agentes físicos y químicos, nos indicará si corresponde a la existencia de esporos u otras formas posibles de resistencia.

Una vez comprobada la esporulación, constituye un nuevo elemento utilizable en identificación de los microbios esporulados la forma de la germinación de los esporos; para ello hágase una gota pendiente con caldo de cultivo y póngase en ella unos cuantos esporos; dispóngase todo en la platina del microscopio dentro de la cámara caliente de Plehn o en una de las de platina y, después de enfocar un esporo determinado, obsérvese todo el tiempo que emplee en germinar para ver si es polar, en el sentido del eje mayor del esporo o ecuatorial, en sentido perpendicular.

Necesidad de oxígeno.— Verifíquense dobles siembras en diferentes medios de cultivo; déjese un ejemplar de cada una en

la estufa y las otras dispónganse en estricta anaerobiosis; por el crecimiento en cada uno de los lotes deduciremos si el microbio en cuestión es aerobio, anaerobio o capaz de desarrollarse en ambas condiciones. La prueba más sencilla consiste en sembrar por diseminación en un tubo de agar, ocupado por el medio de cultivo, sin aire, en dos terceras partes; si el cultivo se desarrolla solamente en la superficie, nos encontramos en presencia de un aerobio; si en la profundidad de un anaerobio, y si lo hace en la casi totalidad del tubo será capaz de vivir de ambos modos, indicándose la preferencia por uno u otro por la profundidad del mayor crecimiento.

Terrenos de cultivo y temperatura preferidos. — Háganse siembras repetidas en los más diferentes medios y llévense a estufas de cultivo a distintas temperaturas, juzgando por la intensidad y rapidez del crecimiento, sobre cuáles son los medios más apropiados, la temperatura óptima y entre qué límites de calor es posible su desarrollo.

Aparición de formas involutivas o degenerativas. — Los cambios de la presión osmótica determinados por las variaciones de la concentración de los líquidos en que viven los microbios, así como otras acciones químicas poco conocidas, pueden hacer aparecer en muchos de ellos formas degenerativas o involutivas. Pues bien: en ocasiones, el fenómeno adquiere tal constancia que puede constituir un elemento importante en el diagnóstico de un determinado microbio. Tal ocurre, por ejemplo, con las formas involutivas del bacilo pestoso cultivado en agar con el 3 por 100 de cloruro de sodio. Para provocar su formación apelaremos, según los casos, al envejecimiento, a la adición de unas gotas de la disolución concentrada de yoduro potásico, a los medios con cloruro de sodio al 3 por 100, con cloruro de magnesio o de calcio al 4 por 100, etc.

Fermentación de los hidratos de carbono. — Ensáyase en medios privados de los hidratos de carbono por los procedimientos mencionados en el capítulo destinado a la preparación de los medios de cultivo adicionados del 0'25 al 1 por 100 del que se quiere experimentar, y para muchos microbios será preciso el ensayo con varios de éstos hasta averiguar cuáles son fermentados y cuáles no, ya que la especialidad nace del conjunto de hidratos fermentados.

La fermentación se pone de manifiesto por la aparición de pases o por los cambios de la reacción del medio, por la producción de ácidos y álcalis.

Formación de gases.—El procedimiento más sencillo para demostrar la producción de gases consiste en sembrar por diseminación en tubos agar con el 1 por 100 del hidrato de carbono correspondiente. Al desarrollarse los gases no encuentran fácil salida, y se forman numerosas burbujas en el espesor del medio, llegándose a fragmentar el agar por muchos puntos, si la cantidad de gas formada es grande. Este procedimiento sólo proporciona una idea grosera sobre la cantidad de gases formados.

La siembra en medios líquidos con recolección de los gases formados constituye un procedimiento más preciso; para ello se coloca el medio en los tubos de Th. Schmith, que tienen la forma de V con una rama larga, cerrada y graduada, y la otra corta, abierta y ensanchada en esfera; póngase en la rama corta la cantidad necesaria de medio de cultivo para que rellene la rama larga y la parte inferior de la corta; tápese la abertura con algodón, y esterilícese todo en el autoclavo: el calor desaloja el aire de la rama cerrada, sustituyéndolo por vapor de agua, que en el momento del enfriamiento se condensa, quedando completamente llena por el líquido la rama cerrada; siémbrese después como cualquier otro tubo de cultivo y llévese a la estufa; los gases formados a expensas del medio contenido en la rama cerrada no pueden salir y van quedando encerrados en la parte alta, al mismo tiempo que el líquido es lanzado hacia la otra. Este procedimiento permite además hacer alguna experiencia sobre la naturaleza de los gases recogidos. Con mucha frecuencia son mezclas en proporciones variables de CO_2 y H_2, y añadiendo lejía de sosa en exceso, se absorbe el CO_2 y queda solamente el H_2, viéndose por la disminución de volumen la cantidad que correspondía a aquél.

El tubo de Schmith, así como el de Dunbar, que consiste en un tubo en V, con el mismo grosor en toda su longitud y sin soporte, resultan de manejo poco práctico, y nosotros recomendamos el sencillo dispositivo de Durham, que consiste sencillamente en un tubo ordinario de cultivo, con el medio

apropiado, en el que se introduce invertido un tubito de 8 milímetros de diámetro por 80 milímetros de largo, cerrado por uno de sus extremos; esterilícese en autoclavo, y al enfriarse quedará relleno el tubo invertido por la misma razón que se llenaba la rama cerrada del tubo de Schmith: siémbrese como cualquier otro tubo y llévese a la estufa; los gases producidos a expensas del medio encerrado en el tubito no podrán salir y se acumularán en la parte alta. El tubito puede estar graduado y puede practicarse la alcalinización a fin de averiguar la composición relativa del gas recogido.

Para el estudio químico completo del gas producido será preciso verificar las siembras en matraces provistos de llaves de seguridad, con un tubo de desprendimiento que conduzca los gases formados a una campana pneumática de agua o mercurio, según los casos.

Cambios de la reacción del medio. — Para la demostración cualitativa es suficiente la preparación de los medios de cultivo, añadiéndoles la cantidad de disolución de tornasol al 1 por 100, suficiente para que tenga coloración violeta y vire con una gota de la disolución decinormal de un ácido o un álcali. En la observación de los cambios de coloración compárese siempre un tubo no sembrado con los que lo fueron. Mejores resultados que con las tinturas preparadas en cada Laboratorio se suelen obtener con ciertas tinturas preparadas por casas especialmente dedicadas a la preparación de materias colorantes y substancias químicas, siendo una de las preferidas la de Kahlbaum.

La determinación cuantitativa se verifica como una determinación acidimétrica o alcalimétrica, valiéndose de la disolución $^1/_{10}$, $^1/_{20}$, o $^1/_{100}$ normal de ácido o álcali y la disolución alcohólica de fenolptaleína como reactivo indicador.

En la apreciación colorimétrica de la reacción no se olvide que, con frecuencia, los microbios reducen las materias colorantes, y no se confunda el cambio de color con la decoloración, y tanto en un procedimiento como en el otro no se pierda de vista que la reacción que determinamos es la global dependiente de la fermentación del hidrato de carbono añadido, en la que se pueden producir substancias ácidas y alcalinas a la par, aunque de ordinario predominen las ácidas, y de la degra-

dación de las materias albuminoideas, en la que igualmente se pueden producir las dos clases, aunque superen las alcalinas. Compárese siempre el título obtenido con el del medio sin sembrar.

Producción de indol. — En la degradación progresiva de las substancias albuminoideas se producen numerosos cuerpos, que seguramente tendrán una gran aplicación al diagnóstico de las bacterias, así que la química haya progresado suficientemente en esta clase de estudios; pero en la actualidad el único empleado con este objeto es el indol. Los cultivos que tienen indol en presencia del ácido sulfúrico y el nitrito potásico toman color rojo, y se dice que dan la reacción del indol; pero hay algunos microbios que no sólo producen indol, sino que reducen los nitratos contenidos en el medio a nitritos y toman el color rojo con sólo añadir el ácido sulfúrico, llamándose la reacción en este caso del nitroso-indol o indol-nitroso.

Los medios azucarados en que se producen muchos ácidos dificultan la reacción del indol, debiéndose verificar las siembras en agua de peptona con nitrato (pág. 248). Pruébese en primer lugar la reacción del nitroso-indol, añadiendo al cultivo 1 cent. cúb. de ácido sulfúrico al cuarto o tantas gotas de ácido sulfúrico concentrado como centímetros cúbicos de agua de peptona tiene el cultivo y póngase en baño maría a 80°, hasta que aparezca el color rojo. No se olvide que el indol es volátil, y a una temperatura superior a 80° se puede marchar, no apareciendo la reacción. Si al cabo de cinco minutos la reacción no se presenta repítase en otro tubo, añadiendo la misma cantidad de ácido sulfúrico y 1 cent. cúb. de nitrito potásico al 0'01 por 100. Tanto en un caso como en otro, así que aparezca el color rojo, añádanse 2 o 3 cent. cúb. de alcohol amílico, agítese y déjese en reposo para ver si el alcohol al flotar se lleva consigo el color rojo.

Además del procedimiento de Salkowski, que acabamos de describir, también se puede poner de manifiesto el indol por el de Ehrlich: a 10 cent. cúb. de cultivo se añaden 5 centímetros cúbicos de la siguiente disolución:

Paradimetilamidobenzaldehido.....	4	partes.
Alcohol al 96 por 100.....	380	—
Ácido clorhídrico concentrado.....	80	—

y 5 cent. cúb. de la disolución acuosa saturada de persulfato potásico; se agita bien, apareciendo dentro de los cinco minutos una coloración roja, que se lleva el alcohol. Por regla general, las indicaciones de los dos procedimientos coinciden; pero, según los trabajos de Böhme, hay algunos microbios que muestran distinto comportamiento, según el procedimiento que se emplee, y debe tenerse en cuenta que los datos proporcionados por las obras de bacteriología, en tanto que nada especial se indique, se refieren al procedimiento de Kitasato-Salkowski. También se puede emplear el procedimiento de Morelli, que consiste en sujetar dentro de los tubos de cultivo, por medio del tapón de algodón, tiras de papel empapadas en una disolución saturada en caliente de ácido oxálico, que se tiñen de rojo si existe desprendimiento de indol.

Formación de ácido sulfhídrico. — Se puede demostrar sujetando en el interior de las vasijas de cultivo, por medio de los tapones, en tubos laterales de los recipientes o de cualquier otro modo, tiras de papel impregnado de alguna sal de plomo, preferentemente el carbonato, tartrato o acetato, que se ennegrecerán si hay desprendimiento de hidrógeno sulfurado. Resulta preferible, sin embargo, el añadir a los medios de cultivo, en especial los sólidos, tartrato o subacetato de plomo en la proporción del 1 por 1.000 al 1 por 500, que no impiden el desarrollo de los microbios, a menos de existir en el medio muchos hidratos de carbono fermentables, en cuyo caso, al formarse los ácidos, se pueden formar sales de plomo muy solubles. No se olvide que el ennegrecimiento puede ser producido por otras substancias que, como el mercaptan, son formadas por algunos microbios.

Poder reductor. — Los procedimientos para comprobarlo se basan en la transformación de ciertas materias colorantes, en leucoderivados o en la reducción de algunas sales metálicas, que se transforman en óxidos metálicos o dejan en libertad el metal. Entre los primeros, los más corrientes consisten en la adición a los terrenos de cultivo de sulfo-índigotato sódico, tintura de tornasol o azul de metileno al 1 por 1.000, debiendo tenerse en cuenta que la reducción solamente tiene lugar en los sitios privados de la acción del oxígeno, y que, agitando los medios para que el oxígeno se redisuelva, se regenera el

color. Los selenitos y teluritos son las sales metálicas más utilizadas en la preparación de los segundos; añadiéndoles una gota de la disolución al 2 por 100 a cada 10 cent. cúb., en caso de reducción, aparece un color rojo, si hemos empleado la sal de selenio y gris negruzco o negro, si fué la de teluro.

Formación de colores. — Los colores formados por los microbios no se desarrollan constantemente, y con frecuencia no coincide el óptimo crecimiento con la formación del pigmento, no debiendo olvidarse los siguientes principios en su comprobación. Por regla general, los colores aparecen más fácilmente en frío y, por ejemplo, será conveniente colocar en frío los cultivos desarrollados de los estafilococos para que tomen intensamente el color correspondiente. La rápida resiembra en los medios usados en los laboratorios, a la par que favorece el desenvolvimiento de los microbios, agota rápidamente su facultad cromógena, debiendo verificar resiembras tardías de los cultivos conservados en frío. De ordinario, pequeñas cantidades de magnesio, azufre y una reacción ligeramente ácida del medio, favorecen la producción de substancias coloreadas, siendo conveniente el añadir a los medios el 2 por 1.000 de sulfato de magnesia y glicerina o azúcar para que a sus expensas se produzcan ácidos. La acción de la luz perjudica.

Una vez desarrolladas las substancias coloreadas, es preciso determinar sus disolventes ensayando su extracción por agua fría o caliente, alcohol etílico absoluto, alcohol amílico, cloroformo, éter, benzol, sulfuro de carbono, etc.

Fosforescencia. — Fabríquense los medios con agua de mar, con caldo de pescados marinos, o con caldo de carne con el 1 por 100 de peptona, el 0'5 por 100 de glicerina y el 3 por 100 de cloruro de sodio, y obsérvense los cultivos desarrollados en la obscuridad durante algún tiempo. Esta propiedad en muchos microbios es sumamente fugaz, observándosela en los cultivos muy jóvenes. Siendo necesaria la presencia de una buena cantidad de oxígeno, los cultivos deben ser superficiales.

Resistencia a la acción de agentes físicos y químicos. — En el estudio de la resistencia a los distintos agentes exteriores, no perderemos de vista la necesidad de que la acción se verifique por igual sobre todo el material sometido a su influencia para que no queden porciones a las que no llegue o lo haga difícil-

mente, y conservando vivos un gran número de gérmenes falseen notablemente los resultados; por esta razón procuraremos verificar las experiencias sobre pequeñas masas para que la superficie de acción del agente ensayado sea la más grande posible.

Del mismo modo no es indiferente la naturaleza del líquido en que se encuentran sumergidos los microbios, pues en el momento de actuar el agente se pueden producir condensaciones o coagulaciones en torno que, dificultando la penetración, le defiendan y hasta invaliden con frecuencia la acción, como ocurre, por ejemplo, con el sublimado contra los microbios colocados en líquidos muy albuminosos.

En estas determinaciones se tomará nota detallada de la intensidad del agente y de la duración de su acción y demás condiciones que puedan interesar, y en cuanto a los efectos, precisaremos el momento en que se impide la evolución del germen sin matarle, lo cual supone que colocado en medio apropiado se desarrollará de nuevo y las condiciones en que con la muerte del microbio todo desarrollo ulterior está impedido, llamándose a la primera acción antiséptica y a la segunda desinfectante. Si el microbio es esporulado, será necesario hacer todas las determinaciones sobre las formas vegetativas y sobre los esporos.

Los microbios que han de ser objeto de la experiencia, se pueden disponer en medios líquidos o adheridos a soportes sólidos por una desecación previa. El primer método se practica absorbiendo el líquido portador de los microbios dentro de tubitos capilares que se cierran a la lámpara por ambos extremos, cuando se trata de estudiar la acción del calor, o mezclando porciones determinadas del líquido con los agentes químicos; el segundo, mucho más empleado para los agentes químicos y desecación, consiste en impregnar con el cultivo hilos de seda, lana, algodón, etc., perlas de vidrio, bastoncitos de cristal o trocitos de cubre-objetos, o fragmentos de otras materias en relación con nuestro fin, desecándolos a continuación en vasijas cerradas con cloruro de cal o ácido fosfórico, y mejor todavía, haciendo pasar una corriente de aire desecado con cualquiera de ambas materias, producida por una trompa de aspiración.

Para estudiar la *resistencia al calor* se colocan los tubitos cerrados, las hebras o perlas en baño-maría, al vapor fluente o en autoclavo, y de tiempo en tiempo, se extrae uno de ellos que se siembra en los medios de cultivo apropiados; el tiempo de acción variará notablemente según se trate o no de bacterias esporuladas, y aun dentro de las que no los tienen, la resistencia es muy variable. Es muy importante en estas determinaciones asegurarse de que la temperatura obtenida en el sitio en que tenemos colocados los microbios es la que nos hemos propuesto, valiéndonos para ello de termómetros introducidos en los mismos baños-maría, colocando con los materiales materias fusibles a la temperatura que deseamos, o introduciendo en los grandes aparatos de desinfección termómetros de máxima, que a la temperatura deseada cierran un circuito y hacen sonar un timbre dispuesto fuera del aparato.

La influencia de la *desecación* se estudia colocando las hebras o perlas en el aparato de desecación y sembrándolas periódicamente, a partir del comienzo de la desecación, hasta que resulten las siembras estériles.

En el estudio de los *agentes químicos* habremos de determinar la proporción que hemos de añadir a los medios de cultivo para impedir que los microbios se desarrollen, y qué cantidad y qué tiempo de acción se necesita para que las hebras o perlas introducidas queden completamente libres de gérmenes. En esta segunda parte es preciso que al transportar las hebras o perlas al medio de cultivo, sean abundantemente lavadas a fin de que no queden impregnadas de la suficiente cantidad de antiséptico para que la primera acción se produzca y juzguemos destruído un germen, cuando en realidad lo que hemos hecho es simplemente impedir su desarrollo.

Formación de toxinas.—Aunque casi entra su estudio en el de la acción patogénica de los microbios, realmente ésta es mucho más compleja que la simple producción de toxinas. Su estudio se hace inoculando a los animales, en cantidades y formas distintas, cultivos en que se han quitado los microbios cuando se trata de las ectotoxinas o toxinas que se han disuelto en el medio de cultivo o extractos de los microbios obtenidos por procedimientos distintos para cada uno cuando nos proponemos investigar las endotoxinas, proteínas u otros productos

tóxicos existentes en el cuerpo de los microbios. La separación de las bacterias de los medios de cultivo en que se encuentran se verifica por filtración al través de bujías que no permitan el paso de los microbios, por centrifugación o invalidando la acción patógena del germen por esterilización que no altere la naturaleza de la toxina en aquellos casos en que los cuerpos microbianos no contengan toxinas apreciables.

Además de las ecto y endotoxinas, desarróllanse con frecuencia en los medios de cultivo otras toxinas sumamente interesantes para el diagnóstico de los microbios, especialmente las hemolisinas, como ocurre en el tétanos, estreptococos, estafilococos, vibriones, etc. Estas son substancias capaces de destruir los hematíes, poniendo en libertad la hemoglobina que se disuelve en el líquido en que se encuentran suspendidos, tiñéndolo de color rojo intenso. Para ponerlas de manifiesto pueden emplearse distintos procedimientos, según que mezclemos cultivos filtrados con los hematíes o añadamos los glóbulos rojos a los medios de cultivo, sólidos o líquidos, en que hemos sembrado el microbio. El primer modo se verifica añadiendo a 1 cent. cúb. de la dilución de glóbulos rojos, lavados al 5 por 100, en solución salina isotónica, cantidades mayores e menores de los cultivos filtrados, siempre en el mismo volumen de líquidos, observándolos después de una acción más o menos prolongada, según la actividad de la hemolisina, desenvuelta, generalmente, a las dos horas de estufa o a las veinticuatro en frío.

El procedimiento más comunmente empleado es el segundo; cuando se trata de siembras en medios líquidos, caldo, por ejemplo, se añade a cada tubo de cultivo 1 cent. cúb. de hematíes lavados al 5 por 100, llevándolos a la estufa después de sembrados para que se desarrolle el microbio; si la hemolisina aparece tardíamente, para evitar la hemolisis espontánea por el tiempo transcurrido, será conveniente añadir los hematíes cuando los cultivos estén desenvueltos suficientemente. En los medios sólidos se mezclan los glóbulos con el medio fundido, y enfriado a 40° si es el agar, y, después de bien mezclados y sembrados, se vierten en placas de Petri y se solidifican. También se puede verificar la siembra sobre el medio extendido y solidificado en superficie. Las colonias de los microbios

productores de hemolisinas se reconocerán por la transparencia que el medio adquiere en torno de ella; algunos microbios no llegan a producir una evidente hemolisis, limitándose a una transformación de la hemoglobina sin producirse la transparencia del medio.

La hemolisis debe ser ensayada con hematíes de distintos animales, pues las hemolisinas no actúan igualmente sobre todos ellos.

El estafilococo inoculado en la pleura del conejo, forma una substancia nociva para los leucocitos, que ha recibido el nombre de leucocidina, y de manera análoga se pueden demostrar en los cultivos de distintos microbios substancias perjudiciales para determinados elementos celulares.

II.—Métodos de estudio de las reacciones biológicas

Los microbios o sus toxinas introducidos en el organismo animal, obrando como antígenos, son capaces de estimular la producción de substancias que por su presencia *in vitro* o *in vivo* invalidan las toxinas, aglutinan los microbios, precipitan albuminoides disueltos, se fijan sobre las bacterias o las disuelven y estimulan la fagocitosis. Todas estas acciones antitóxicas, aglutinantes, precipitantes, bacteriolíticas, fijadoras y bacteriotrópicas u opsónicas son específicas hasta cierto grado, no teniendo lugar para un determinado anticuerpo sino en presencia del antígeno correspondiente y cifrándose la especificidad en la adaptación perfecta entre el antígeno y el anticuerpo; siempre que la reacción tenga lugar y conozcamos uno de los dos términos podremos concluir lógicamente que el desconocido era el correspondiente, pudiendo servir, por consiguiente, para la investigación del antígeno o del anticuerpo.

1. Acción antitóxica.

Se utiliza como contraprueba de la acción tóxica; si la producción de toxina es suficientemente enérgica, basta la inyección de la dosis correspondiente de un cultivo muerto o filtrado, para que se produzca la muerte con síndrome y lesiones tan

características que bastan para demostrar la naturaleza del microbio que hemos aislado; pero si esta acción tóxica no es tan marcada como ocurre con frecuencia con el bacilo diftérico, e inoculado en el tejido conjuntivo subcutáneo solamente determina la formación de un edema no del todo característico, ayudará bastante a esclarecer nuestras dudas si al mismo tiempo que la inoculación de toxina del microbio en cuestión produce edema, la inoculación de la mezcla de dicha toxina y antitoxina diftérica, indudable, en cantidades proporcionadas, no ocasiona la más mínima alteración en el sitio de la inoculación. Cuando nos ocupemos del diagnóstico bacteriológico de la difteria insistiremos en esta cuestión.

2. Aglutinación.

A) Macroscópica.

Primer caso. INVESTIGACIÓN DEL ANTÍGENO. 1.° *Obtención del suero específico.*—Se obtiene en el conejo común, eligiendo animales de 3 kilogramos en adelante para que proporcionen buena cantidad de suero; se le inocula el primer día, por vía intravenosa, un asa de un cultivo en agar de veinticuatro horas de incubación, emulsionado en 1 cent. cúb. de solución salina isotónica y muerto por calentamiento a 60°, una hora, en baño maría; a los siete días se le inyectan tres asas y siete días después de esta segunda inyección cinco asas del cultivo en las mismas condiciones; de siete a diez días después de la tercera inyección se sangra el animal asépticamente por la carótida, se recoge la sangre en tubos de coagulación con vástago interior y a las veinticuatro horas de estancia en sitio fresco, no en helera, se recoge el suero separado que se conserva mezclado con 0'5 por 100 de ácido fénico y siempre en sitio fresco y obscuro. También se puede conservar desecándolo en el vacío o en el desecador de Faust-Heim mediante una intensa corriente de aire caliente, pulverizando el suero desecado y colocando en ampollitas de cristal caramelo a razón de 0'2 gramos por ampolla.

Si el microbio fuera demasiado toxígeno, como ocurre con el

disentérico Shiga-Kruse, se comenzará por un centésimo de asa, duplicando la dosis en las cinco siguientes; si después de la tercera inyección la cantidad de antitoxinas, demostradas por un examen previo con una pequeña cantidad de suero extraída por vía de ensayo, es deficiente, se puede hacer una cuarta con 10 asas, pero teniendo en cuenta que si después de esta cuarta inyección la proporción de aglutininas no aumenta, no se debe insistir más preparando otro animal.

Deben emplearse siempre sueros del más alto título posible, dentro de la especie.

2.º *Preparación de las diluciones del suero específico.* — En una gradilla dispónganse 15 o 16 tubitos de los especiales para aglutinación, idénticos en forma a los de ensayo, pero de 10 × 1 cent.; utilizando constantemente pipetas esterilizadas, póngase en los tres primeros tubos A, B y C, 2'7 centímetros cúbicos de solución salina esterilizada; al A, añádasele 0'3 cent. cúb. del suero específico, hágase perfectamente la mezcla y llévese 0'3 de ella al tubo B, y después de mezclar igualmente bien, llévese 0'3 de esta segunda al tubo C, y mézclese. Cada uno de los tres tubos contendrá, por consiguiente, 3 cent. cúb. de una dilución al 1/10, el A; al 1/100, el B, y al 1/1.000 el C, constituyendo las diluciones madres de que hemos de partir para hacer la serie.

A continuación háganse las siguientes diluciones:

Tubo	1	1 cent. cúb. de la dilución A	..... 1/10
—	2	0'5 — — — A	más 0'5 sol. salina. 1/20
—	3	0'2 — — — A	— 0'8 — — 1/50
—	4	1 — — — B	..... 1/100
—	5	0'5 — — — B	más 0'5 sol. salina. 1/200
—	6	0'2 — — — B	— 0'8 — — 1/500
—	7	1 — — — C	..... 1/1.000
—	8	0'5 — — — C	más 0'5 sol. salina. 1/2.000
—	9	0'2 — — — C	— 0'8 — — 1/5.000
—	10	0'1 — — — C	— 0'9 — — 1/10.000
—	11		1 — — Testigo.
—	12	Igual al tubo 10 con el microbio correspondiente al suero	Testigo.

Hemos supuesto que trabajamos con un suero específico que tiene por título el 1/10.000, es decir, que aglutina el germen que sirvió para prepararle hasta esta dilución; si el título fuera distinto, llegaríamos siempre hasta la dilución marcada por el título como límite y con esta misma dilución prepararemos el testigo núm. 12.

Además de este procedimiento, usado corrientemente en muchos laboratorios, que recomendamos por su sencillez, puede utilizarse un segundo que no le va en zaga. Póngase en el primer tubo 1'8 cent. cúb. de solución salina y 1 cent. cúb. en cada tubo de los siguientes de una larga serie; añádase al primero 0'2 de suero específico y mézclese bien aspirando y soplando alternativamente con la pipeta que nos sirvió para poner el suero específico; tómese 1 cent. cúb. de esta mezcla y añádase al centímetro cúbico de solución salina del tubo segundo; mézclese bien de la misma manera y llévese 1 centímetro cúbico al tubo tercero y así sucesivamente hasta agotar todos los tubos. De este modo en el primer tubo quedará 1 centímetro cúbico de una disolución al 1/10, en el segundo al 1/20, y en los siguientes al 1/40, 80, 160, 320, 640, 1.280, 2.560, 5.120, 10.240 respectivamente. Añádanse dos tubos testigos idénticos a los 11 y 12 del cuadro anterior.

3.° *Emulsión del microbio.* — En cada uno de los tubos se emulsiona un asa de un cultivo en agar de veinticuatro horas, frotando el cultivo sobre la pared sin tocar el líquido, de modo que a medida que se emulsiona vaya cayendo; la pared se humedece de tiempo en tiempo inclinando más el tubo para que el líquido llegue cerca del sitio donde estamos haciendo la emulsión, pero sin tocarla, y después de vuelto a su posición, tocamos con el hilo de platino la pequeña porción de líquido que ha quedado adherida a la pared. Procediendo con calma, se obtienen emulsiones perfectas siempre, a menos que se trate de microbios difícilmente emulsionables.

En el tubo testigo núm. 12, se emulsiona de la misma manera un asa de un cultivo de veinticuatro horas en agar de un microbio bien comprobado que corresponda al suero específico empleado, y sirve de comparación entre el microbio que investigamos y uno auténtico de la naturaleza que sospechamos.

También se puede hacer la emulsión del microbio de una

vez, colocando en un tubo de ensayo unos cuantos centímetros cúbicos en relación con el número de tubos que hemos de utilizar en la reacción, y emulsionando el número de asas suficiente para que la emulsión tenga un aspecto lechoso doblemente intenso, del que resulta por el procedimiento anterior; las diluciones del suero se preparan de modo que estén a la mitad en medio centímetro cúbico y después se añade con la pipeta a cada tubo medio centímetro cúbico de la emulsión, con lo que el volumen total será de un centímetro cúbico y las diluciones quedarán al título debido. Esta manera de proceder parece tener la ventaja de preparar una emulsión única, con lo que aparecerá igual en todos los tubos, pero esto no es más que hasta cierto límite, pues a poca experiencia que se tenga, las emulsiones resultan tan perfectas hechas aisladamente, que todos los tubos se ven iguales, y además se hacen mejor en tubos que no contienen más que 1 cent. cúb. de líquido que no en los que contienen varios. Mas prescindiendo del aspecto técnico de la mayor o menor facilidad de hacerlas, hemos de tener en cuenta que trabajamos con microbios peligrosos, y la aspiración en las pipetas, por medio de la boca, está erizada de peligros de contagio, de tal manera, que buen número de infecciones gravísimas y hasta mortales adquiridas en los laboratorios se debieron a estas manipulaciones; es verdad que el transporte se puede hacer mediante pipetas armadas de peras de goma para la aspiración, pero resultan de manejo difícil y exponen a que el líquido se vierta por todas partes, todavía más que utilizando la boca.

4.° *Observación de la aglutinación.* — Si la aglutinación ha de ser positiva se produce instantáneamente al emulsionar los tres primeros tubos, es decir, entre el 1/10 y el 1/100, según la intensidad que ha de tener; pero de todos modos es necesario colocar los tubos durante media hora por lo menos en la estufa a 37° antes de observarlos; si al cabo de este tiempo la aglutinación no es positiva o lo es con poca intensidad, déjese más tiempo en estufa o veinticuatro horas en frío antes de llegar a una conclusión.

La observación de los tubos se hace colocándolos delante de una ventana, levantando el tubo por encima de nuestros ojos para que destaque sobre el fondo del techo menos iluminado,

e inclinándole para que se forme una capa fina; iluminados los coagulitos por reflexión, destacarán notablemente del fondo más obscuro. Si hacemos la observación con luz artificial, nos guiaremos siempre del mismo principio, procurando que nuestros ojos vean el tubo sobre un fondo obscuro y la luz caiga oblicuamente; con arreglo a este principio, se han fabricado aparatos especiales para la observación de las aglutinaciones, que, si proporcionan comodidades, no son necesarios. Observando los tubos de esta manera, a partir de las diluciones menores a las mayores; si la aglutinación fué positiva, veremos la aparición de coágulos gruesos en los primeros tubos, después se tornarán más finos, hasta llegar a un tubo en que nos cuesta trabajo decidir si existe o no aglutinación, y finalmente, en los últimos tubos, si no alcanzó al título del suero específico, ya no veremos aglutinación. A continuación de la observación a simple vista, volveremos a mirar todos los tubos en la misma posición, valiéndonos de una lente, y entonces precisaremos mejor el último tubo en que se ven coágulos, llegando a percibirlos en algún tubo más que en la observación a simple vista, y diremos que la aglutinación es positiva hasta el título correspondiente a la dilución de este último tubo.

Cuando la observación de la aglutinación se verifica a las veinticuatro horas, encontraremos precipitados en el fondo de los tubos, los grumos de aquéllos en que tuvo lugar la aglutinación, sobre todo en los primeros, y en cambio, no se habrán precipitado los demás; pero no debemos conformarnos con esto, sino que después de agitar los tubos para que el precipitado se distribuya uniformemente en el líquido, procederemos a la observación, como acabamos de indicar, pues lo verdaderamente característico es la aparición de los coágulos.

En el tubo testigo núm. 11, que contiene solamente solución salina con microbios emulsionados, no debe existir aglutinación, pues en caso contrario es señal de que el microbio se aglutina espontáneamente en presencia de la solución salina, como ocurre con algunos vibriones y otros bacilos, y no podemos confiar en los resultados obtenidos. El tubo testigo número 12, con el título del suero específico y bacilos bien comprobados de la especie que sirvió para la preparación del suero específico, debe resultar aglutinado; en caso de que el micro-

bio empleado no se haya aglutinado intensamente, debe repetirse, poniendo en lugar de un solo tubo de esta naturaleza varios con diluciones menores, por si el microbio o el suero hubieran perdido en poder aglutinante.

Titulación del suero específico.— En la aglutinación que acabamos de practicar hemos partido de un suero específico de título conocido; pero si este título no estuviera determinado, haríamos previamente la titulación verificando una aglutinación del modo indicado en los números anteriores, entre la raza del microbio correspondiente al suero específico y este suero, y consignaríamos como título el de la dilución más alta en que todavía se percibiera la aglutinación.

Segundo caso.— INVESTIGACIÓN DEL SUERO.— 1.° *Obtención del suero del enfermo.* — Utilizando la misma técnica que hemos descrito en la cuenta de glóbulos para procurarnos la sangre necesaria por punción de la yema del dedo o el lóbulo de la oreja, se extraen unas cuantas gotas, que se depositan en un tubo de centrífuga esterilizado; centrifugando o dejando en reposo unas horas mientras tiene lugar la coagulación, se separa el suero que se recoge con finas pipetas.

Pröscher recomienda recoger las gotas que se forman en tubos de 2 milímetros de diámetro exterior, semejantes a los utilizados para envasar la vacuna, por capilaridad, cerrando los extremos con lacre a la llama, y Czaplewski en tubos de centrífuga, cerrados con tapones de corcho que ajusten bien, atravesados en su centro por un vástago metálico, que en el extremo que ha de quedar en el interior del tubo lleva atado un pequeño copo de algodón hidrófilo; esterilizado todo debidamente, con el algodón se empapan las gotas que salen, se pone el tapón en el tubo y se centrifuga, desprendiéndose el suero del algodón y quedando depositado en el tubo de cristal. Todos estos procedimientos sirven, convenientemente acondicionados, para la remisión a los laboratorios de la sangre precisa para estas indagaciones serológicas. Pero el mejor método de obtener sangre, por las pocas molestias que proporciona y su comodidad, es sacar 5 a 10 cent. cúb. de una vena, por medio de la jeringuilla, con todas las precauciones asépticas; se vierte el contenido en un tubo de centrífuga y se extrae el suero.

2.° *Preparación de las diluciones del suero del enfermo.*— Se preparan del mismo modo que hemos descrito en el primer caso para el suero específico; pero teniendo en cuenta que generalmente se trabaja con escasa cantidad de suero, conviene más el empleo del segundo modo, o sea partir de una sola dilución al 1/10 en el primer tubo para duplicar el divisor del título de tubo a tubo por mezcla con un volumen igual de solución salina; si la escasez del suero es grande, póngase en el primer tubo 1 cent. cúb. de la dilución y 0'5 cent. cúb. de solución salina en todos los demás, de conformidad con Müller. Por otra parte, por razones fáciles de comprender, raramente el suero de los enfermos alcanza el mismo poder de aglutinación que el suero que nosotros preparamos en los laboratorios en el conejo, no necesitando pasar de ordinario de la dilución al 1/500.

3.° *Emulsión del microbio.* — Emulsiónese en cada tubo un asa de un cultivo en agar de veinticuatro horas de una raza bien caracterizada del microbio que se sospecha ser el causante de la enfermedad. Cuando la reacción deba ser practicada en laboratorios clínicos, en que no resulta cómodo el mantenimiento permanente de los microbios, que pueden ser necesitados en estas investigaciones, pueden utilizarse, siguiendo a Ficker, emulsiones de micrcbios muertos, con el 0'5 por 100 de ácido fénico y el 10 por 100 de lactosa, que se venden preparadas por los grandes laboratorios, con la concentración debida, y se mantienen utilizables varios meses. Claro es que en caso de emplear las emulsiones preparadas de ésta u otra manera, será preciso tener en cuenta las observaciones que hemos hecho en el caso anterior, a fin de concentrar la cantidad necesaria de suero específico en 0'5 cent. cúb., completando después el centímetro cúbico por la adición de 0'5 centímetros cúbicos de la emulsión microbiana preparada; pero es mucho más cómodo hacer diluciones sin tener en cuenta esta adición, resultando reducidos todos los títulos a la mitad, con lo que sólo prescindiremos del primero al 1/10, que quedará transformado en 1/20 desde luego, resultando el resto de la serie completamente igual; o hacer la dilución inicial al 1/5, con lo que no faltará ni el primer tubo al 1/10.

Si el microbio o la emulsión microbiana están recientemente

comprobados por otras aglutinaciones positivas, solamente necesitaremos un tubo testigo con emulsión en solución salina o volúmenes iguales de ambos elementos; si no está comprabada, necesitaremos otro testigo con emulsión y un suero específico positivo, sobre todo cuando la aglutinación resulte negativa.

4.° *Observación de la aglutinación.*—Se hace de la misma manera que en el caso primero.

B) Microscópica.

Si las circunstancias del caso exigen una gran premura en los resultados, apelaremos al microscopio para ver la aparición de la aglutinación sin aguardar a las veinticuatro horas; para ello basta colocar una gota de cada tubo de la aglutinación macroscópica, después de media hora de estufa en un cubre-objetos y observarlos en gota pendiente. También se puede hacer la observación microscópica desde el primer momento, colocando en otros tantos cubre-objetos, una gota de las diluciones al 1/100, 1/500 y 1/1.000 del suero específico, si investigamos el antígeno, o de las diluciones al 1/20, 1/50 y 1/100, si se trata del suero de un enfermo; a continuación, en cada gota se emulsiona una pequeña cantidad del microbio correspondiente, hasta que el líquido se vea opalino, y se disponen en gota pendiente en porta-objetos excavados, rebordeando con vaselina o parafina; se observan al microscopio, una vez preparadas las gotas pendientes, y después se las lleva a la estufa para volverlas a observar a la media hora. Hágase una gota pendiente con solución salina sin suero específico, que sirve de testigo.

Si la aglutinación es positiva, al microscopio aparecerán los microbios aislados o con sus agrupaciones naturales y persistirán los movimientos en los que se movían en la gota testigo, en tanto que en las gotas con suero específico estarán inmóviles y reunidos en grandes masas, tanto mayores cuanto más grande es la intensidad del suero; si la aglutinación es negativa, los microbios estarán repartidos más o menos uniformemente en todos los tubos, según la perfección con que hicimos la emulsión, no habiendo diferencia alguna entre los tubos con suero específico y el testigo.

C) De orientación.

Constituye una ayuda eficacísima en el aislamiento de muchos microbios unida a la extensión en superficie. Cuando se investigan las colonias desarrolladas sobre una placa de Petri, en muchas ocasiones nos vemos perplejos para decidir si existen colonias del microbio que buscamos, porque dichas colonias no son lo suficientemente características o porque están mezcladas con las de microbios que se parecen bastante, siendo imposible, por el simple examen, aun ayudándonos de una lente y el microscopio, resolver en uno u otro sentido; esto nos llevaría forzosamente a la necesidad de resembrar un gran número de colonias, multiplicándose el tiempo y el material necesarios para cada investigación diagnóstica; pues bien, todo se simplifica notablemente apelando a la aglutinación de orientación.

Se verifica poniendo en la mitad de un porta-objetos bien limpio unas cuantas gotas separadas de una dilución al 1/100 de un suero específico de alto título, y en la otra mitad un número igual de gotas de solución salina; en seguida, con una aguja de platino recta y flameada, se toca la colonia sospechosa y se emulsionan los microbios adheridos en una gota con suero específico hasta que aparezca una ligera opacificidad; a continuación se flamea de nuevo, se vuelve a tocar la misma colonia y se hace lo mismo en una de las gotas de la solución salina, observando con una iluminación idéntica a la que hemos recomendado para observar en general las aglutinaciones; si el microbio corresponde al suero, veremos producirse evidentes aglomeraciones a la par que el líquido pierde la opalescencia, en la gota con suero específico, en tanto que en la gota sin suero la emulsión continúa opalina y sin grumos.

Procediendo con la rapidez necesaria, se pueden examinar en poco tiempo un gran número de colonias, resembrando exclusivamente de aquéllas en que la aglutinación es más evidente. No se debe prescindir, en modo alguno, de la comparación con la gota sin suero específico, pues frecuentemente los microbios se aglutinan en presencia de la solución salina, tenga o no suero específico, y podemos llegar a conclusiones erró-

neas. También se suelen aglutinar las emulsiones cuando la solución salina se concentra por desecación, siendo preciso que observemos las gotas inmediatamente de hechas, pues si la aglutinación ha de ser positiva, se realiza casi instantáneamente. En la observación debemos ayudarnos de la lente.

D) En las infecciones asociadas.

Con frecuencia el suero de un enfermo aglutina dos o más microbios, debiendo resolverse la cuestión de si tal aglutinación mixta se verifica con las mismas aglutininas por tratarse de una reacción de grupo, es decir, de microbios muy semejantes en propiedades o con aglutininas diferentes, desarrolladas a la par en el mismo organismo, influenciado por dos antígenos o microbios distintos en las infecciones asociadas.

Esta cuestión se resuelve mediante el procedimiento de la absorción fraccionada de las aglutininas de Castellani; si ponemos en presencia de un suero que tiene aglutininas una cantidad de antígeno suficiente para que sean absorbidas todas las aglutininas y por centrifugación o decantamiento separamos el antígeno del suero, veremos que éste ha quedado privado de aglutininas, que han sido arrastradas por el antígeno; pues bien, si en un suero que tiene aglutininas para dos microbios separamos por saturación las correspondientes a uno de ellos, quedarán las del otro, y si tiene para muchos, podremos separar las de todos ellos por saturaciones sucesivas. Generalmente, el problema se circunscribe a dos microbios, y así, por ejemplo, supongamos tener un suero que es capaz de aglutinar los bacilos A y B; emulsiónese en $^1/_2$ o 1 cent. cúb. del suero de 4 a 10 asas de cultivo en agar de veinticuatro horas del microbio A; déjese la emulsión doce horas en estufa a 37° o veinticuatro horas en frío, y separando los microbios por centrifugación, recójase el suero y pruébese si todavía contiene aglutininas para el microbio A; si contiene, repítase la emulsión de otra cantidad igual de bacilos A y llévese de nuevo a la estufa doce horas; si no contiene ya aglutininas para el bacilo A, verifíquese la aglutinación con el bacilo B; en caso de que la aglutinación resulte positiva, como anteriormente, que-

dará probado que en el suero existían también aglutininas para el bacilo B, mientras que si, por el contrario, la aglutinación con este bacilo ha desaparecido del suero con las aglutininas del bacilo A, se demostrará que se trataba de una reacción de grupo.

3. Precipitación.

1.° *Antígeno.* — Lo constituyen cultivos en caldo filtrados por bujía para separación de las bacterias, debiendo ser perfectamente transparentes. También pueden servir extractos bacterianos obtenidos por maceración de microbios muertos de diferentes modos, en solución salina u otros líquidos. De los cultivos filtrados o extractos se ponen en tubos especiales de precipitación de unos 0'5 × 7 u 8 centímetros con el fondo cónico, 1 cent. cúb.

2.° *Suero específico.* — Se obtiene en el conejo por el mismo procedimiento que los sueros aglutinantes, pudiéndose emplear también la inoculación subcutánea. Cuando se trata de averiguar la existencia de precipitinas en el suero de un paciente, entonces el suero específico lo constituye el suero del enfermo, que extraeremos por punción o de la vena, según la cantidad que necesitemos. A cada tubo que ya contiene el antígeno se añade 1 cent. cúb. de una dilución del suero en sentido decreciente, de modo que en el primer tubo añadiremos 1 cent. cúb. de suero puro, al segundo de una dilución al $^1/_2$, al tercero al $^1/_5$, al cuarto al $^1/_{10}$ y al quinto al $^1/_{20}$ (véase para su preparación la pauta de las diluciones del suero aglutinante).

3.° *Suero normal.* — Con suero de animal sano de la misma especie que el que ha proporcionado el suero específico prepárense igual número de diluciones, que se añadirán a otros tantos tubos con antígeno y que sirven de testigos.

4.° *Observación de la precipitación.* — Examínense los tubos a las cuatro horas; en aquéllos en que la precipitación es muy intensa, se produce un fuerte enturbiamiento, que va disminuyendo a medida que la precipitación decrece, hasta llegar a los tubos en que no existe precipitación, que continúan transparentes. Vuelva a examinarse a las veinticuatro horas y en-

tonces encontraremos sedimentados los precipitados, siendo la cantidad de sedimento proporcional a la intensidad de la precipitación en cada tubo. La turbidez se ve mejor sobre un fondo negro.

Esta reacción, llamada por algunos de Kraus, se puede verificar también poniendo cantidades decrecientes del antígeno y una cantidad constante del suero específico. En general, la reacción de precipitación es bastante menos usada que las demás en la identificación de los microbios.

4. Acción bactericida.

A) Reacción de Pfeiffer.

Primer caso.— INVESTIGACIÓN DEL ANTÍGENO. — 1.° *Obtención del suero específico.* — Se obtiene en el conejo por una sola inyección intraperitoneal de un cultivo entero en agar de veinticuatro horas, muerto a 60° durante una hora, emulsionado en solución salina, con sangría a los catorce días y extracción del suero, o, lo que es más frecuente, por inyecciones repetidas cada siete o diez días de cultivos muertos en las mismas condiciones, subcutánea o peritonealmente, en cantidades variables, si el cultivo es bastante tóxico, como ocurre en muchos vírgulas, uno, tres y cinco asas; en el tífico y otros menos tóxicos, medio, uno y dos cultivos; también se pueden combinar las vías subcutánea y peritoneal, según consejo de Besserer y Jaffé, para el tífico primero medio cultivo, más tarde uno subcutáneo y después medio, uno y dos cultivos intraperitoneales, con intervalos de diez días. Generalmente, se suelen mezclar los sueros procedentes de varios conejos para unificar los títulos. Ténganse en cuenta las observaciones hechas respecto a la obtención del suero específico en la aglutinación.

2.° *Preparación de las diluciones del suero específico.* — Prepárense cuatro pocillos de cristal con tapadera, que llamaremos A, B, C y D; en cada uno se ponen 0'9 cent. cúb. de caldo de cultivo, no debiendo emplearse ni solución salina ni agua de peptona.

Al pocillo A le añadiremos cinco veces el título del suero

específico, entendiendo por tal la cantidad necesaria de suero para provocar la transformación en gránulos en una hora en el peritoneo del conejillo de Indias, a una cantidad de bacilos equivalente a diez veces la dosis mínima mortal; siendo normalmente este título de 0'0002 gramos, vamos a suponer que es el del suero que empleamos en la reacción, y añadiremos, por consiguiente, 0'1 cent. cúb. de una dilución del suero específico al 1/100 que contendrá 0'001 de suero en definitiva.

Al pocillo B le añadiremos diez veces el título del suero específico, o sea 0'1 de una dilución al 1/50 que contendrá 0'002 gramos.

Al pocillo C una cantidad de suero normal de conejo equivalente a cincuenta veces el título del suero específico, es decir, 0'1 cent. cúb. de una dilución del suero normal al 1/10, que contendrá 0'01 de suero.

Al pocillo D le pondremos simplemente 0'1 cent. cúb. de solución salina sin suero específico.

Para la preparación de las diluciones correspondientes, véase la pauta de la aglutinación.

3.° *Adición del antígeno.* — Añádase a cada pocillo una cantidad de microbios diez veces mayor que la dosis mínima mortal, y como de ordinario, se consigue la muerte de un conejillo de Indias de 200 gramos con 0'0002 o sea 0'1 de asa normal, el décuplo está representado por el asa, de un cultivo en agar a 37° dieciocho horas. Emulsiónese, pues, en cada pocillo un asa de cultivo en agar a 37°, dieciocho horas, del microbio que tratamos de identificar, de modo análogo a como recomendamos en la aglutinación.

4.° *Inyección intraperitoneal al conejillo de Indias.* — Ténganse preparados cuatro conejillos de Indias de 200 o 250 gramos de peso, con señales que correspondan a los pocillos y un pequeño ojal en la mitad inferior de la pared del vientre. Mézclese bien el contenido del pocillo A, y con una jeringa provista de una cánula roma, métasele en el peritoneo del modo descrito al ocuparnos de la inoculación intraperitoneal, al conejillo primero; de la misma manera se introduce en el segundo el contenido del pocillo B; en el tercero, el del C, y en el cuarto, el del D.

5.° *Observación de la reacción.* — Prepárense cuatro cubre-

objetos bien limpios montados en otras tantas pinzas de Cornet y cuatro portas excavados rebordeados de vaselina. Estírense a la lámpara un buen número de tubos de cristal para fabricar bastantes pipetas capilares, que se depositan en un vaso de cristal. A los veinte minutos se rompe la extremidad cerrada de una de las pipetas capilares y se pincha la pared del vientre del conejillo núm. 1; tan pronto como la punta penetra en el peritoneo, asciende por capilaridad el líquido que introdujimos en el peritoneo; extraígase la pipeta y deposítese una gota, que no sea muy grande, en el centro del primer cubre, colocándolo inmediatamente sobre la primera célula en gota pendiente. Hágase lo mismo con cada uno de los otros conejillos, teniendo buen cuidado de señalar las gotas pendientes que corresponden a cada uno, pues en caso de equivocación o de duda, todo el trabajo resultaría perdido.

Examínense al microscopio las cuatro células y anótese con todo cuidado su contenido, es decir, si son microbios móviles o inmóviles, microbios y gránulos, gránulos solamente o no se ve nada.

A la hora se repite la preparación de células, volviendo a extraer nuevamente exudado peritoneal y la observación al microscopio, anotando los resultados, y, finalmente, se dejan los conejillos debidamente atendidos en las jaulas correspondientes para observarlos en los días siguientes.

La transformación de los bacilos de las mezclas A y B en gránulos, a la hora, denota una reacción positiva, pero no debemos hacer nuestro juicio definitivo hasta el día siguiente; la reacción, evidentemente positiva, debe producir la muerte de los dos testigos inyectados con las mezclas C y D, y de los dos inyectados con suero específico, resultará completamente defendido el que recibió la mezcla B con diez veces el título, e incompletamente defendido, retrasándose la muerte con relación a los testigos, el que recibió cinco veces el título con la mezcla A. Si perecen los cuatro, es que el suero carece de facultades defensivas por completo para aquel microbio, y, por consiguiente, no se trata del microbio correspondiente al suero específico, resultando la reacción negativa. En cambio, la supervivencia de los conejillos inyectados con las mezclas A y B, demuestra que el microbio es poco virulento y debe repetirse

la prueba después de intentar levantar su virulencia, pero no debe inyectarse más de un asa de cultivo por conejillo. Por regla general, los microbios recién aislados de los productos patológicos son bastante virulentos, perdiendo esta condición con su permanencia en los laboratorios.

6.° *Titulación del suero específico.* — Si el suero específico ha sido preparado por nosotros antes de utilizarlo, será preciso titularlo, averiguando cuál es la cantidad menor de dicho suero que defiende al conejillo de Indias de 200 a 250 gramos, contra un asa de cultivo en agar dieciocho horas a 37°. Para ello se preparan en caldo, diluciones del suero al 1/10.000, 1/5.000, 1/1.000, 1/500, 1/100, 1/50; se emulsiona en un centímetro cúbico de cada una, un asa de cultivo en las condiciones indicadas y se inyecta intraperitonealmente a otros tantos conejillos de Indias, poniendo los mismos testigos C y D. Si mueren los testigos, la dilución menor recibida por los conejillos que se han salvado, corresponderá al título.

Segundo caso.— INVESTIGACIÓN DEL SUERO DE UN ENFERMO O CONVALECIENTE (diagnóstico retrospectivo del cólera). — Se verifica la reacción como en el primer caso, preparando las diluciones en caldo con el suero del enfermo al 1/100, 1/50 y 1/20, mezclando 1 centímetro de cada una, con un asa de un microbio bien caracterizado de la especie que sospechamos e inyectando estas mezclas, más la C y D del caso anterior en el peritoneo de otros tantos conejillos de Indias.

B) Demostración de la acción bactericida «in vitro».

Todos los procedimientos basados en la mezcla de los distintos elementos que integran la reacción de Pfeiffer *in vitro*, aunque tienen la ventaja de la gran economía que resulta de prescindir del empleo de conejillos, son tan poco seguros, que hasta el presente no han tomado carta de naturaleza en el diagnóstico corriente de las infecciones, limitándonos por esta razón a dar una idea de la modificación de Stern y Korte al método de Neisser y Wechsberg.

1.° Prepárese una dilución inicial de suero específico inactivado media hora a 56° al 1/100, al 1/50 o 1/10, si se trata del suero de un enfermo.

2.° Colóquese en 15 tubos 1 cent. cúb. de solución salina estéril; añádase al primero 1 cent. cúb. de la dilución matriz del suero; mézclese bien y llévese 1 cent. cúb. de esta mezcla al segundo tubo, y así sucesivamente en los 12 primeros tubos. Como dijimos, en la aglutinación, cada tubo tendrá una cantidad de suero que será la mitad del anterior, cambiando el título en consonancia.

3.° Añádase a cada uno de los 15 tubos 0'5 cent. cúb de una emulsión de un cultivo en agar de veinticuatro horas 37°, en 5.000 veces de solución salina.

4.° Póngase en los primeros 12 tubos y en el 15 0'5 centímetros cúbicos de una dilución de suero normal de conejo recién extraído al 1/12, que funciona de complemento. A los tubos 13 y 14, en lugar de esta dilución, se les pone la misma cantidad de solución salina para que el volumen sea el mismo.

5.° Llévense a la estufa de 37° todos los tubos, menos el 13; el contenido de éste se mezcla con el agar, fundido a 40°, contenido en un tubo, viértase la mezcla en una placa de Petri y solidifíquese rápidamente.

6.° Después de una permanencia de tres a cuatro horas en la estufa, confecciónese con cada tubo y agar una placa de Petri, de modo análogo a como hemos hecho con el tubo 13, y llévense todas las placas solidificadas a la estufa.

7.° Desde las doce horas obsérvense las placas. Donde la acción bactericida ha sido absoluta no crecerá ninguna colonia del microbio ensayado; a medida que la acción bactericida sea menor, aumentará el número de colonias, hasta llegar a un máximum, representado por el número de colonias de la placa 13, que contenía solamente microbios y solución salina, pues la 14, que reunía las mismas condiciones, como ha sido sembrada después de la permanencia en la estufa, probablemente contendrá mayor número de gérmenes, como la 15.

5. Fijación del complemento. (Reacción de Bordet y Gengou).

Su técnica ha sido notablemente modificada por Wassermann, Bruck, Citron y otros autores.

PREPARACIÓN DE LOS ELEMENTOS QUE LA INTEGRAN

1.° *Antígeno.* — En el primitivo procedimiento de Bordet y Gengou empleábanse los microbios; los distintos modificadores de la reacción apelan a los extractos bacterianos obtenidos de distintos modos, y nosotros utilizamos la emulsión de un cultivo en agar de veinticuatro horas a 37°, en cantidad variable de solución salina, generalmente 20 cent. cúb., de modo que la dosis de antígeno oscile entre 0'5 y 0'05 cent. cúb. La emulsión se mata a 60° durante una hora.

2.° *Amboceptor bacteriano.* — Es el suero de conejo preparado de modo análogo a los sueros aglutinantes y bacteriolíticos, debiendo tenerse presente que no existe relación entre el poder aglutinante o bacteriolítico de un suero y su contenido en anticuerpos para la fijación del complemento, dependiendo, sobre todo, de la raza microbiana, empleada en la preparación del animal. Véanse las reglas dadas para la preparación de los sueros aglutinantes y bacteriolíticos. El suero será inactivado a 56° durante media hora.

3.° *Complemento.* — Es el suero de conejillo de Indias recién extraído. Sángrese un conejillo, obténgase el suero por centrifugación y dilúyase en solución salina al 1/10. Como se altera pronto debe ser siempre fresco.

4.° *Hematíes de carnero.* — Se obtienen por sangría de la yugular con jeringa o trócar o en el matadero. Recójase la sangre en un matraz esterilizado provisto de bolas de vidrio para desfibrinar; mézclese la sangre desfibrinada con 10 o 20 veces su volumen de solución salina al 0'85 por 100, centrifúguese, sepárese el líquido con una pipeta y vuelva a añadirse una nueva cantidad de solución salina; agítese y centrifúguese de nuevo para separarla. Después de estos dos lavados en solución salina, dilúyanse los glóbulos obtenidos en solución salina al 5 por 100.

5.° *Amboceptor hemolítico anticarnero.* — Es el suero de un conejo preparado por una doble inyección intraperitoneal de 20 o 30 cent. cúb. de glóbulos de carnero o por tres inyecciones intravasculares de 1 a 5 cent. cúb. con cinco días de intervalo, y rebajando la dosis en lugar de aumentarla para evi-

tar en lo posible los fenómenos anafilácticos, o por tres inyecciones de 1 cent. cúb. cada una en tres días sucesivos y sangría del séptimo en adelante. Debe ser inactivado a 56° durante media hora.

DOSIFICACIÓN DE LOS DISTINTOS ELEMENTOS

Ante todo, no se pierda de vista un solo momento que si en todas las reacciones de inmunidad la relación de los distintos elementos tiene una gran importancia, en ésta es mucho mayor por el gran número de factores distintos que contribuyen. Por esta razón debe procurarse que cada uno de los elementos que intervienen estén contenidos siempre en un volumen constante de solución salina, y que, por consiguiente, el volumen total del líquido empleado en la reacción sea también el mismo; así la cantidad necesaria de cada elemento debe estar contenida en 1 cent. cúb. de solución salina, si disponemos de suficiente cantidad de todos ellos, siendo el volumen total de 5 centímetros cúbicos; pero si el suero específico es insuficiente o algún otro elemento, y esto ocurre frecuentemente, dispondremos cada elemento en 0'5 cent. cúb., y el total será 2'5 centímetros cúbicos. Como la reacción es exactamente igual en los dos casos y con frecuencia nos encontrábamos imposibilitados de poder emplear el centímetro cúbico, desde hace tiempo se emplea constantemente en muchos laboratorios el $^1/_2$ centímetro cúbico para cada uno de los elementos, y nosotros nos referiremos constantemente a esta cantidad. En caso de gran necesidad puede referirse cada elemento a una cantidad menor, 25, por ejemplo.

De los elementos que intervienen en la reacción, se usan en cantidad constante los hematíes de carnero, 0'5 cent. cúb. de la dilución al 5 por 100, y el complemento, 0'5 cent. cúb. de la dilución al 1/10, pero los otros tres factores son variables y han de determinarse las cantidades a emplear por comparación con los elementos fijos, comenzando por titular el amboceptor hemolítico, continuando con el antígeno y terminando por el amboceptor bacteriano en los casos en que no sea éste el factor desconocido y se haga la titulación, por consiguiente, con la reacción total.

Titulación del amboceptor hemolítico. — Tiene por objeto determinar la mínima cantidad necesaria para hemolizar 0'5 centímetros cúbicos de hematíes. Prepárense en una gradilla una serie de tubos y póngase en ellos los siguientes elementos:

Núm.°	Amboceptor hemolítico.	Solución salina.	Complemento al 1/10.	Hematíes 5 %
1	1 cent. cúb. al 1/100	0'5	0'5	0'5
2	0'5 »	1	»	»
3	0'2 »	1'3	»	»
4	1 1/1000	0'5	»	»
5	0'5 »	1	»	»
6	0'2 »	1'3	»	»
Testigos. 7	2 1/100	—	—	»
Testigos. 8	—	1'5	0'5	»
Testigos. 9	—	2	—	»

Llévense todos los tubos a la estufa a 37° durante media hora; al cabo de este tiempo, véase la reacción, y si no hay hemolisis en ninguno de los testigos, tómese como unidad hemolítica la cantidad correspondiente al último tubo en que haya hemolisis, empleando como dosis en las reacciones de fijación del complemento de una y media a tres unidades, y nosotros empleamos constantemente tres. En general, conviene preparar sueros suficientemente activos para que la unidad no pase de 0'002 cent. cúb.

Determinación de la dosis fijadora espontánea del antigeno o del suero.—Casi todos los elementos que intervienen en la reacción son capaces de fijar el complemento por sí solos siempre que haya cantidad suficiente, consistiendo esta determinación en averiguar la cantidad de antígeno o suero específico que es capaz por sí sola de fijar el antígeno, para emplear en la reacción cantidades menores.

Para ello prepárense los siguientes tubos:

Núm.°	Antígeno o suero específico	Solución salina. C.	Complemento al 1/10.	Sistema hemolítico (0'5 de hematíes y 3 unidades hemolíticas del amboceptor).
1	0'5	0'5	0'5	1 cent. cúb.
2	0'3	0'7	»	»
3	0'2	0'8	»	»
4	0'1	0'9	»	»
5	0'05	0'95	»	»
6 Testigo	—	1	»	»

Póngase primero en cada tubo el antígeno o suero específico, la solución salina correspondiente y el complemento, llévenselos a la estufa a 37°, y a la hora, añádase en todos los tubos el sistema hemolítico, que llevará diez minutos mezclado y en la estufa. Pónganse de nuevo los tubos en la estufa y a la media hora obsérvese el estado de la hemolisis en el tubo testigo; si es completa, compárese el estado en los demás tomando nota de los tubos en que la hemolisis es completa, incompleta o negativa. La hemolisis completa, se reconoce en el completo aclaramiento del líquido con enrojecimiento; la incompleta, en que ambos fenómenos comienzan, y la negativa, en que el líquido continúa incoloro y turbio por los hematíes; estos fenómenos se aclaran notablemente si dejamos los tubos en frío hasta el día siguiente, viéndose entonces en los primeros, un depósito blanco con un líquido completamente rojo; en los segundos, sedimento de color rojizo inversamente proporcional a la intensidad del color del líquido, y en los últimos, sedimento intensamente rojo con líquido incoloro. En la observación, a las doce o veinticuatro horas, la hemolisis, que comenzaba a la media hora, suele estar terminada, y en cambio ha comenzado la hemolisis en tubos que no presentaban la menor señal, debiendo darse por terminada la reacción a la media hora, tiempo a que hicimos la observación en la titulación del amboceptor hemolítico.

Generalmente, el tubo o tubos que contienen mayor cantidad de antígeno fijan el complemento y no presentan hemoli-

sis, que suele ser bien marcada en todos los demás. La cantidad de antígeno o suero específico a emplear en las fijaciones del complemento está representada por la mitad de la dosis, que ya no fija el complemento.

Titulación del amboceptor bacteriolítico. — Esta titulación sólo es precisa cuando se trata de identificar el antígeno, pues en el caso contrario la titulación del amboceptor específico resulta en el momento de verificar la reacción total. Por esta razón, describiremos primeramente la reacción de fijación del complemento, como si tratáramos de identificar un suero, y luego haremos las aclaraciones necesarias sobre las modificaciones que deban hacerse cuando se trate de titular el amboceptor, para la identificación de un antígeno.

REACCIÓN DE FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO CON SUERO DESCONOCIDO

Lo primero que habremos de hacer es titular el amboceptor hemolítico, titulación que al expresar la relación entre los hematíes, elemento fijo, amboceptor hemolítico y complemento, elementos variables, sirve, hasta cierto punto, de titulación al complemento, y por eso debe repetirse tantas veces como cambiemos este elemento; a continuación, determinaremos cuál es la dosis del antígeno y del suero específico, que no fijan el complemento para partir de la mitad. En la prueba siguiente suponemos que estas dosis son 0'2 para el antígeno y 0'2 para el suero.

Para la reacción dispondremos los siguientes tubos (véase el cuadro de la pág. 333).

Puesto en los tubos el antígeno, suero y complemento, llévese una hora a la estufa y añádase, al cabo de este tiempo, el sistema hemolítico preparado diez minutos antes. Llévense de nuevo a la estufa y véase el resultado a la media hora; si la reacción es positiva, faltará la hemolisis en una cantidad mayor o menor de los tubos que contienen los cinco elementos, marcándose el título del suero por la dosis menor que sea capaz de fijar. De los testigos, los tubos 12, 14 y 15 deben estar hemolizados.

Núm.°	ANTÍGENO — 1/2 dosis no fijadora en 0'5.	SUERO A PROBAR — Dosis en 0'5.	Complemento al 1/10. . . .	Sistema hemolítico, globulos y amboceptor. . .
1	0'1	0'5 de la dilución al 1/5	0'5	1
2	»	0'4	»	»
3	»	0'3	»	»
4	»	0'2	»	»
5	»	0'5 » 1/50	»	»
6	»	0'4	»	»
7	»	0'3	»	»
8	»	0'2	»	»
9	»	0'5 » 1/500	»	»
TESTIGOS 10	0'2	—	»	»
TESTIGOS 11	0'2	—	—	»
TESTIGOS 12	—	0'2 suero puro	0'5	»
TESTIGOS 13	—	0'2 » »	—	»
TESTIGOS 14	Antígeno bacteriano heterólogo 0'5	0'5 dilución al 1'5	0'5	»
TESTIGOS 15	0'1	0'5 suero normal	0'5	»

NOTA. Complétese el volumen de cada elemento a 0'5 con solución salina isotónica.

De no emplear una gran cantidad de tubos, probablemente será preciso siempre verificar la reacción dos veces, utilizando la primera de tanteo y la segunda precisando bien entre los límites obtenidos en la primera, o a partir de ellos en sentido descendente. Cuando la prueba del suero se hace como titulación, para proceder a la prueba de un antígeno, empléese como antígeno el mismo microbio que sirvió para preparar el suero.

PRUEBA COMPLETA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE UN ANTÍGENO

Titúlese el amboceptor hemolítico, determínese la dosis fijadora del antígeno y del suero específico, para no pasar en el empleo de ambos de la mitad de la dosis que no fija; titúlese el suero específico para emplear como dosis fija en todos los

tubos cinco veces la dosis menor que es capaz de fijar en presencia del antígeno específico, siempre que no llegue al límite de la fijación espontánea, y después practíquese la reacción.

Para ella pondremos los mismos tubos que en la prueba del suero, pero poniendo en todos los tubos la misma cantidad de suero, y haciendo que, en cambio, las cantidades del antígeno disminuyan desde la dosis mitad de la no fijadora, siguiendo la misma pauta que hemos empleado en la prueba anterior para disminuir las cantidades del suero, completando siempre la cantidad de cada elemento, hasta 0'5 cent. cúb. por adición de solución salina. Póngase un tubo testigo más que contenga la dosis máxima de antígeno, pero con antígeno específico bien caracterizado.

Puestos en los tubos el antígeno, el suero específico y el complemento, llévense a la estufa, y a la hora añádase el sistema hemolítico, preparado diez minutos antes de añadirlo; después de otra media hora de permanencia en la estufa, véase el resultado de la reacción.

CAPÍTULO VI

TÉCNICA ESPECIAL DE LOS DISTINTOS MICROBIOS PATÓGENOS

En este capítulo llamaremos particularmente la atención sobre las propiedades características de cada microbio y modos especiales de recogerlas, no mencionando siquiera todo aquello que en nada se aparte de la técnica general y reuniendo los microbios en grupos por sus afinidades técnicas.

1.° Cocos Gram-positivos. Estafilococos, estreptococos y pneumococos.

La *agrupación de estos cocos en racimo, cadenas y diplococos,* carácter morfológico que ha servido para su clasificación, debe ser apreciado en gota pendiente o preparaciones coloreadas por los métodos corrientes, de los cultivos en caldo,

pues con los cultivos en medios sólidos se obtienen con frecuencia grandes aglomeraciones, en las que cuesta trabajo percibir, o no se percibe de ninguna manera, la especial manera de agrupación. De todos modos, al verificar las extensiones, obraremos con delicadeza para no romper las larguísimas cadenas que algunos estreptococos muestran en los cultivos en medios líquidos.

Se *cultivan en los medios comunes,* existiendo, en términos generales, una gradación bien marcada entre los estafilococos, que crecen muy bien; los estreptococos, que crecen menos y se agotan con rapidez en el mismo cultivo y en los sucesivos pases, y los pneumococos, que a veces crecen con dificultad, siendo conveniente verificar las primeras siembras en caldo o agar con suero, sangre, preferentemente de conejo, ascitis o en suero Lœffer, y se agotan tan rápidamente, que hay que resembrarlos cada veinticuatro o cuarenta y ocho horas, perdiéndose rápidamente a pesar de los mayores cuidados. La adición de glucosa a los medios de cultivo, parece favorecer el desarrollo de todos estos microbios, y para el pneumococo, especialmente, se recomienda el aumento de la cantidad de peptona del 2 al 4 por 100. Para conservar la virulencia, es conveniente evitar los pases en medios artificiales, siendo lo mejor conservar en helera, fuera de la acción de la luz y en tubo cerrado a la lámpara para evitar la desecación, un cultivo bien desarrollado; si es un cultivo líquido, se le puede solidificar por la adición de dos tercios de gelatina al 15 por 100, según el consejo de Truche, Cramer y Coloni, para el pneumococo.

Agentes productores de procesos inflamatorios, supurados o no, y septicemias, habremos de encontrarlos en el pus procedente de estos procesos, en los exudados de las mucosas inflamadas y en la sangre.

Examen del pus. — Debe ser recogido asépticamente; si se trata de un proceso abierto, lavaremos con el mayor cuidado la superficie supurada o la parte exterior de los trayectos, para evitar la contaminación con los microbios existentes en la superficie de la piel y mucosas, y aguardaremos a que salgan nuevas cantidades o esprimiremos los trayectos para expulsar el contenido en las porciones profundas.

Si el pus ha de ser sembrado en presencia del enfermo, se re-

coge con la misma aguja de siembra; si hemos de enviarlo a un laboratorio, se hará caer en un tubito esterilizado, cuando es grande la cantidad que fluye, o se introduce en un tubo capilar o se empapa un algodoncito esterilizado. El primer tubo se cierra con un tapón de goma o corcho, todo esterilizado, y se lacra; el tubo capilar se cierra a la lámpara y el algodón se introduce en tubo esterilizado, que se cierra como acabamos de indicar; de cualquiera de estas formas puede ser remitido el pus por correo, convenientemente embalado.

El examen bacteriológico debe comenzar por la confección de preparaciones coloreadas con los colorantes comunes y el método de Gram. Procúrese extender con el mayor cuidado para no destrozar los leucocitos, a fin de observar si los microbios están o no fagocitados. Con frecuencia, en el pus producido por estreptococos, se ven cadenas largas o cortas de cocos; pero, con más frecuencia todavía, el examen directo sólo permitirá apreciar cocos Gram-positivos, de aspecto poco característico.

El aislamiento se verificará por extensión directa en tubos o placas, o con dilución previa, si en el examen directo hemos apreciado una gran riqueza en gérmenes (véase el capítulo IV).

Al examinar las placas téngase presente siempre que en la piel y mucosas existen estafilococos, estreptococos y pneumococos saprofitos, y que en los procesos abiertos se suman con frecuencia al productor de la lesión, sin que tengan la menor participación en la acción patógena, y que al pinchar la piel en los procesos cerrados, para extraer el pus, pueden contaminarle. En consecuencia, una de las primeras cuestiones que hemos de resolver en presencia de las colonias de estos microbios encontradas en las placas, es si se trata de un saprofito o un microbio patógeno.

En el caso de que las colonias del microbio en cuestión predominen notablemente sobre las demás, tenemos un fuerte indicio en pro de su intervención en el proceso, y lo mismo ocurre en los casos en que, a pesar del escaso número de colonias, se encuentra en cultivo puro; en cambio, cuando el número de colonias de los diferentes microbios, sean muchas o pocas, discrepa poco, nos veremos perplejos en el juicio.

Debe hacerse siempre el examen y resiembra de la mayor cantidad posible de colonias sospechosas, para resolver la cuestión por el estudio ulterior.

Aislamiento especial del pneumococo. — El hecho de encontrar en los esputos de los pulmoníacos un diplococo con todos los caracteres del de Frænkel, no basta para sentar la afirmación de que sea éste el agente productor, pues es bien sabido que en la saliva de muchos individuos sanos existe con frecuencia el pneumococo.

Comenzaremos el examen del esputo con la coloración de extensiones por los métodos comunes, el Gram y los especiales para cápsulas; en seguida inocularemos una pequeña cantidad subcutáneamente en la base de la cola del ratón, y, en caso de no disponer de ratones, utilizaremos el conejo; el animal sucumbe a las veinticuatro o cuarenta y ocho horas, víctima de una septicemia, y entonces se hacen extensiones de los distintos órganos y de la sangre, encontrando grandes cantidades de diplococos lanceolados, Gram-positivos, envueltos en cápsulas, que se tiñen con los colorantes apropiados; siémbrese por extensión en agar-ascitis, agar-suero o agar sangre, y aíslese el germen de las placas después de veinticuatro horas a 37°.

Examen de la sangre. — Como el examen de la sangre en las septicemias producidas por estos cocos no difiere técnicamente del de otras septicemias más frecuentes, y especialmente la producida por el bacilo de Eberth, entonces lo estudiaremos con carácter general.

Acción patógena. — Para medir la del *estafilococo* se inoculan, según Courmont, una o dos gotas de cultivo en caldo en las venas del conejo, que muere, según la virulencia, en cuarenta y ocho horas a veinte días, con septicemia, sin lesiones locales en caso de gran virulencia, con inflamaciones locales (osteomielitis, artritis en los jóvenes), abscesos múltiples (riñón, miocardio, etc.) y piohemia, si la virulencia es mediana, y artritis y osteomielitis de los conejos adultos, si es muy escasa.

Con el *estreptococo* recomiéndase la inyección subcutánea de 1 a 2 cent. cúb. en la base de la oreja, determinando una septicemia mortal en veinticuatro o cuarenta y ocho horas, una erisipela, mortal o no, o simples abscesos, según su virulencia.

Con el mismo fin se emplea la inyección subcutánea en el conejo, de 1 a 2 cent. cúb., de un cultivo en caldo de *pneumococo;* según la virulencia le mata en veinti.uatro a cuarenta y ocho horas con una septicemia, a veces hemorrágica, o provoca lesiones locales. Aunque el animal más sensible a la inyección de pneumococos sea el ratón, no resultará superfluo inyectar al mismo tiempo en el conejo, pues este animal se presta más a la medida de la virulencia.

Aunque no haya completa correspondencia entre la virulencia de estos microbios para el conejo y el hombre, se puede afirmar, con muchas probabilidades de acierto, que estamos en presencia de un microbio patógeno, si lo es para el conejo; en caso contrario, no deberemos concluir nunca que se trate de un simple saprofito.

Hemolisis.— Constituye con la acción patógena un elemento importante en la clasificación de estos microbios, aun desprovisto del carácter absoluto que se le concedió en los primeros tiempos. Los cultivos en caldo de muchos *estafilococos,* hemolizan del cuarto al décimo día de incubación y la experiencia parece demostrar que los estafilococos, completamente desprovistos de acción patógena, no hemolizan nunca.

En los *estreptococos,* la hemolisis se demuestra en los cultivos en caldo, y mejor caldo suero, desde el segundo día y desaparece con frecuencia a los cinco días, habiendo pretendido Schottmüller establecer una relación absoluta entre la formación de largas cadenas en los medios líquidos, la presencia de hemolisis y la enérgica acción patógena, designando a los que presentan estos tres caracteres *streptococcus longus seu erysipelatis,* y los de cadenas cortas, de menos de seis a ocho elementos, virado al verde de la hemoglobina, más bien que propia hemolisis y floja acción patógena *streptococcus mitis seu viridans;* el estreptococo mucoso no hemolítico, pero muy patógeno, corresponde más bien al pneumococo. Esta relación carece de la pretendida precisión, pero se observa con bastante frecuencia, prestando buenos servicios en la caracterización de los estreptococos.

Fermentación de los carbohidratos.—Los estafilococos fermentan la glucosa y la lactosa con producción de ácidos, pero donde comienza a estudiarse esta propiedad para la clasificación es en

los estreptococos, a partir de los trabajos de Gordon; Andresos y Horder han hecho una clasificación que nos parece prematura, y Hopkins y Lang concluyen que los estreptococos de las infecciones humanas se diferencian de los saprofitos por fermentar la lactosa y salicina y no la rafinosa, inulina y manita.

Los pneumococos se diferencian de los estreptococos patógenos en la fermentación de la inulina, recomendándose para la demostración de esta propiedad los cultivos en el medio de Hiss, formados por una parte de suero, dos partes de agua destilada y 1 por 100 de solución de tornasol al 5 por 100; después de calentar a 100°, se añade 1 por 100 de inulina y se esteriliza fraccionadamente a 100°. Lo mismo que la inulina, se pueden añadir otros hidratos de carbono. Los microbios que, como el pneumococo, la fermentan con producción de ácidos, enrojecen el tornasol y enturbian el suero. Tampoco esta diferencia tiene carácter absoluto.

Acción disolvente de la bilis.—Este carácter, introducido en la técnica por Neufeld, se utiliza para diferenciar los pneumococos de los estreptococos; si a cada centímetro cúbico de cultivo en caldo de veinticuatro horas se añade 0'1 cent. cúb. de bilis de conejo, el líquido se aclara en tres a veinte minutos por disolución de los pneumococos, cosa que no ocurre con los estreptococos. En lugar de la bilis se puede emplear la disolución de taurocolato sódico, del 5 al 10 por 100, en solución salina isotónica, o el colato sódico de Merck al 1 por 1.000, en presencia del sulfato de magnesia. Tampoco esta propiedad es absolutamente constante.

Aglutinación.—Generalmente, poco intensa, deben emplearse títulos bajos. En los estreptococos y pneumococos que con frecuencia crecen en grumos o cadenas, es conveniente cultivar, según el consejo de Hiss, en medios líquidos con el 1 por 100 de glucosa y carbonato cálcico para saturar los ácidos que se produzcan o emplear emulsiones de cultivos en medios sólidos. Para el pneumococo recomiendan Besançon y Griffon apelar a la técnica de Vidal, sembrando en el suero del enfermo y en suero normal, creciendo en el primero, en los casos positivos, en grumos o en estreptococos según la intensidad, mientras que en el normal conserva su aspecto característico. Hasta ahora, los resultados obtenidos son poco aprovechables.

2.° Cocos Gram-negativos. Gonococo y meningococo.

Se tiñen bien con los colorantes comunes, debiendo tenerse un cuidado grande, al verificar las extensiones del pus gonocócico o el líquido cefalorraquídeo purulento para que no se destruyan los leucocitos, pues la mayor parte de los microbios, si no todos, a diferencia de los del grupo anterior, se hallan fagocitados en el interior de los leucocitos Para ello es conveniente verificar las extensiones como hemos recomendado en las preparaciones de sangre. La fijación se haría de preferencia con alcohol y éter a partes iguales.

El método de Gram con coloración de fondo mediante la fuchina fenicada diluída al $^1/_{10}$, proporciona excelentes preparaciones de dichos productos patológicos; los teñidos durante un minuto con la mezcla de verde de metilo y pironina de Unna-Pappenheim muestran bellas coloraciones, en que los microbios se tiñen en rojo y los núcleos en azul.

Para el cultivo, y sobre todo en las primeras siembras, deben preferirse las mezclas de los medios ordinarios (caldo, agar) con una cuarta parte de ascitis o las mezclas con sangre.

Encuéntranse en el pus de las lesiones correspondientes o en la sangre en los casos de septicemia. Para obtener el pus uretral lávese bien el meato y, exprimiendo la uretra de atrás a adelante, extráigase una o varias gotas de pus, con las que hacemos el examen directo en las preparaciones y el aislamiento por extensión directa. En las mujeres buscaremos el pus en la uretra o cuello uterino, en las artritis por punción, en la oftalmía purulenta directamente, etc., procediendo del mismo modo que con el pus uretral. Para obtener el líquido cefalorraquídeo se verifica la punción lumbar (pág. 147) se centrifuga o decanta, si no disponemos de centrífuga, se separa el líquido y con el depósito hacemos las preparaciones y las siembras.

Para investigar la presencia de meningococos en la rinofaringe de los enfermos o portadores, dóblese la extremidad de un tallo metálico o alambre grueso, de modo que forme un ángulo obtuso; recúbrase la parte doblada de algodón y esterilícese debidamente protegido; en el momento de sembrar depri-

mase la lengua con la mano izquierda, al mismo tiempo que colocamos la escobilla de algodón por detrás del velo del paladar, y después de frotar la rinofaringe se extrae impregnada de moco. Las preparaciones directas hechas con este moco son de escasa utilidad, por existir siempre microbios morfológicamente semejantes al meningococo: verifíquese el aislamiento por extensión en placas.

Fermentación de los carbohidratos. — Para ponerla de manifiesto se utiliza el medio de Lingelsheim: prepárese una disolución del hidrato correspondiente en tintura de tornasol (a ser posible Kahlbaum) al 10 por 100, y mézclese 1'5 cent. cúb. de esta disolución con 13'5 cent. cúb. de una mezcla de tres partes de agar al 3 por 100 y una de ascitis. Como en todos estos ensayos hemos de investigar gran número de microbios, para ahorrar material y tiempo, siémbrese en una misma placa el mayor número posible de gérmenes, dejando el espacio libre suficiente para que no se influencien recíprocamente.

El gonococo fermenta solamente la glucosa; el meningococo y los parameningococos, la glucosa, la maltosa y no la levulosa; entre los pseudomeningococos, el *micrococcus catharralis* y el *pharingis cinereus* no fermentan ninguno; el *pharingis siccus, pharingis flavus* y *diplococcus crassus* fermentan todos. La variedad III del flavus da las mismas reacciones de fermentación que el meningococo.

Aglutinación. — En el suero de los enfermos aparece de los ocho días en adelante. Para identificar los microbios aislados se verifica del modo descrito en la técnica general con diluciones bajas, del 1 por 100 al 1 por 500, poniendo un tubo con la misma dilución de suero normal y otro con solución salina solamente. Si la aglutinación resulta negativa a 37°, repítase a 55°, pues, como demostró Kutscher, se aglutina más fácilmente a esta temperatura.

Reacción de precipitación de Vincent y Bellot. — El líquido claro que hemos separado por centrifugación del obtenido en la punción lumbar, es colocado en un tubo estéril, y a cada 50 gotas se añaden de una a tres de suero antimeningocócico; en otro tubo se pone una cantidad igual de líquido sin suero; al cabo de dieciséis horas de estancia a 37°, y mejor a 55°, se ve si el tubo que tenía suero antimeningocócico se ha tornado turbio u

opalino, en tanto que el testigo permanece invariable. Aunque esta reacción fracasa a veces, puede sernos útil.

Micrococcus melitensis. — *Se tiñe* con los colorantes comunes, debiendo preferirse la fuchina fenicada diluída al $^1/_{10}$, calentando. *Se cultiva* en los medios comunes, pero crece poco y lentamente, en dos o tres días; en agar-ascitis, el crecimiento es algo más abundante.

Se encuentra en la sangre, donde se puede poner de manifiesto en las dos terceras partes de los casos, en el sedimento de la orina y en la leche de las cabras enfermas o portadoras. Para aislarlo de la sangre, siémbrese de 5 a 10 cent. cúb. extraídos cuando la temperatura alcanza 39°, pues por debajo de 38° no se encuentra, en 200 cent. cúb. de caldo; si se enturbia desde los tres a los cinco días, verifíquese el aislamiento por extensión. Con el sedimento de la orina o la leche, verifíquese el aislamiento por extensión directa.

El germen aislado *se identifica* por sus caracteres morfológicos y biológicos y por la aglutinación con emulsiones de cultivos en agar de tres a cinco días, sin olvidar que algunas variedades de melitococo se aglutinan con el suero normal y que en los enfermos de fiebre de Malta suelen existir coaglutininas para otros microbios, aconsejando Nègre y Raynaud calentar el suero a 56° para destruirlas.

3.° Bacterias Gram-negativas del grupo Eberth-coli-disentería.

Comprende el bacilo de Eberth, los paratíficos A, B y similares, el enteriditis de Gärtner y similares y los disentéricos.

Se tiñen bien con todos los colorantes y *se cultivan* perfectamente en todos los medios.

Según su localización, *se hallan* en la sangre heces, orina, pus.

Hemocultivos. — Son positivos con la sangre procedente de enfermos de fiebre tifoidea, en el 93 por 100 de los casos durante la primera semana; en el 79 por 100, de la segunda; en el 56 por 100, de la tercera, y en el 32 por 100, de la cuarta, según la estadística de Coleman y Buxton.

Desde luego, en el estudio de la sangre de los septicémicos,

prescindiremos del examen directo al microscopio, porque el número de gérmenes existentes en la sangre circulante, rara vez es tan crecido, como no sea en los momentos próximos a la muerte, que permita verlos en una gota, apelando, desde luego, a la siembra de varios centímetros cúbicos, y preferentemente después de un enriquecimiento previo. Como, por otra parte, la sangre tiende a coagularse, dificultándose de este modo el crecimiento de los microbios en ella aprisionados, y contiene con frecuencia anticuerpos no específicos que se oponen al desarrollo de los microbios, se han ideado distintos métodos en que se combinan de modo distinto el enriquecimiento; la dilución de los anticuerpos y la acción anticoagulante.

Método de Kayser-Conradi. — Conradi aconsejó la siembra de la sangre, recién extraída, en bilis de buey con el 10 por 100 de glicerina y el 10 por 100 de peptona, pero Kayser ha demostrado que basta la siembra en bilis sola, recogida asépticamente y decantada, mezclando las de varias vejigas para uniformar la composición, si se quiere impedir la coagulación, disolver los hematíes y oponerse a las acciones bactericidas, distribuyéndola en tubos a razón de 5 cent. cúb. y sembrando en cada tubo de 1 a 2 cent. cúb.

Al mismo tiempo, ante la posibilidad de la existencia de cocos y otros gérmenes productores de septicemias, sembraremos, según Castellani, 1 a 5 cent. cúb. en 200 de caldo, y varios centímetros cúbicos en agar fundido y mantenido líquido a 42°, poniendo 1 a 2 cent. cúb. por tubo de agar y solidificando el contenido de cada tubo en una placa de Petri, siguiendo la técnica de Schottmüller.

Cuando la bilis y el caldo se hayan enturbiado, se examinan al microscopio y se verifica el aislamiento por extensión, como diremos a continuación al ocuparnos de las heces. Las placas serán estudiadas detenidamente resembrando cuantas colonias sean sospechosas por su aspecto y en el examen microscópico.

Método de Kenigsfeld, para el diagnóstico precoz. — Prepárense varios tubos conteniendo cada uno 4 a 5 cent. cúb. del medio Drigalski-Conradi con manita en lugar de lactosa unos y del medio de Endo otros, solidificados todos oblicuamente; añádase a cada tubo de 1 ½ a 2 cent. cúb. de bilis de buey esterilizada, que quedará en el fondo como el agua de condensación

de los tubos corrientes. Siémbrese en cada tubo una pequeña cantidad de sangre de 3 a 5 gotas, mezclándola con la bilis y haciendo que ésta se extienda después por la superficie del agar. Pónganse a 37° creciendo los microbios en la bilis primero y después en la superficie del agar.

Los bacilos tíficos y paratíficos no alterarán el Endo, pero enrojecerán el Drigalski Conradi por fermentación de la manita; el coli y los similares fermentarán y enrojecerán ambos medios. Al mismo tiempo, con los microbios crecidos, podremos hacer la aglutinación.

Aislamiento en las heces y orina.—Se verifica por extensión directa, pero si consideramos que el bacterium coli, saprofito común del intestino, es difícilmente diferenciable de los patógenos del grupo, se comprenderán las dificultades del aislamiento por extensión en los medios comunes, y sobre todo en el agar, empleado de ordinario.

Para facilitar la percepción de las colonias sospechosas, se fabrican medios especiales con lactosa, que es fermentada por el coli y no por los patógenos, un reactivo indicador de la fermentación y una substancia que dificulte el desarrollo de los microbios intestinales.

Medio de Drigalski-Conradi. — 1.° Póngase en maceración, en 2 litros de agua, 1.500 gramos de carne picada durante veinticuatro horas; sepárese el líquido, exprímase la carne y reúnase el jugo con el anterior; hiérvase una hora, y después de añadir 20 gramos de peptona Witte, 20 gramos de nutrosa y 10 de sal, hiérvase otra hora y fíltrese; disuélvanse de 60 a 70 gramos de agar en rama y póngase una hora en autoclavo; alcalinícese débilmente al tornasol, fíltrese y esterilícese.

2.° Enfríese algo el agar anteriormente preparado y añádase la siguiente solución a 40 50°:

Disolución de tornasol Kahlbaum, hervida veinte minutos.....	260 cent. cúb.
Lactosa químicamente pura.....	30 gramos.

Disuélvase la lactosa en el tornasol y cuézase quince minutos, procurando que no pase para evitar la hidrolisis de la lactosa.

3.° Añádase gota a gota una disolución esterilizada de carbonato sódico al 10 por 100 hasta que la espuma que se forma al agitar tenga color azul-violado; al llegar a este punto, añádase 4 cent. cúb. más.

4.° Finalmente, agréguense 20 cent. cúb. de una disolución de 0'1 de cristal violeta B. Höchst en 100 cent. cúb. de agua caliente.

Una vez terminado de confeccionar el medio se distribuye en placas de Petri o se le guarda en matracitos, que contengan cuando más 200 cent. cúb., para evitar calentamientos prolongados para fundirlo, al usarlo.

En este medio el tornasol sirve de indicador a la fermentación de la lactosa y el cristal violeta como antiséptico, resultando rojas y opacas las colonias del coli y los microbios fermentadores de la lactosa, y azules y transparentes las del Eberth y los no fermentadores.

Medio de Endo. — Prepárese 1 litro de agar ordinario al 3 por 100; neutralícese por la adición de 10 cent. cúb. de soda al 10 por 100; añádanse 10 gramos de lactosa químicamente pura, 5 centímetros cúbicos de disolución alcohólica saturada y filtrada de fuchina, y, por último, 25 cent. cúb. de disolución de sulfito sódico al 10 por 100, recién preparada.

El medio que en caliente tiene color rosa, queda incoloro, o casi incoloro, por enfriamiento, y puede ser conservado en la obscuridad y evitando la acción del aire, poniéndolo en frascos con cierre de presión, completamente llenos.

En este medio la fuchina tiene el doble papel de antiséptico e indicador, ya que la rosanilina se transforma en un leucoderivado por la acción del sulfito, y vuelve a recobrar el color rojo por la acción de los ácidos producidos en la fermentación de la lactosa. Las colonias del Eberth y no fermentadores tienen el mismo aspecto que en el agar común, en tanto que las del coli son rojas, teniendo el color una intensidad proporcionada a la producción de ácidos y llegando a adquirir las colonias, cuando el coli es bien típico, un intenso reflejo metálico.

Ambos medios son excelentes para verificar los aislamientos, pero debemos aconsejar el empleo del Drigalski-Conradi en todos los casos en que se busque el Eberth y los no fermentadores, y del Endo cuando persigamos el coli y los fermenta-

dores (análisis de aguas potables utilizando el coli como indicador de la contaminación).

Para verificar el aislamiento cuídese en primer lugar de desecar bien las placas; después extiéndase en ellas por agotamiento una pequeña porción de heces (una o varias asas) o de orina (unas cuantas gotas). A las veinticuatro horas de incubación obsérvense las placas y examínese al microscopio y mediante la aglutinación de orientación, todas las colonias sospechosas, resembrando las de aglutinación positiva y las que sin aglutinar nos ofrezcan dudas.

En los mismos medios y del mismo modo se practica el aislamiento de los microbios que crecieron en los hemocultivos en bilis o en caldo.

Identificación del microbio aislado. — En estos microbios tienen aplicación, además de la comprobación de los caracteres morfológicos y fisiológicos, todas las reacciones biológicas descritas en la parte general, debiendo detenernos exclusivamente en lo referente a la fermentación de los azúcares, carácter importante en la diferenciación de los microbios incluídos en este grupo.

Fermentación de los hidratos de carbono. — Los medios empleados de ordinario con estos microbios son el suero tornasolado de Petruschky, los de Barsiekow y el agar al rojo neutro de Rothberger.

El *suero tornasolado de Petruschky* se vende bien preparado; pero en caso de no poderlo adquirir se prepara del siguiente modo: caliéntase la leche a 40° o 50° y se la mezcla con el mismo volumen de agua común; en seguida se añade ácido clorhídrico diluído al $^1/_{10}$ hasta que se precipite toda la caseína; también se puede emplear el cloruro de calcio; sepárase el suero por filtración, se neutraliza con precisión por medio de la disolución de soda, se esteriliza, se filtra hasta que resulte el suero completamente transparente e incoloro o amarillo verdoso; se le añade tintura de tornasol esterilizada hasta que el líquido tenga color violeta; distribúyase y esterilícese. Hay que tener gran cuidado para no emplear más que el ClH preciso, pues un exceso es perjudicial aun después de neutralizado, siendo conveniente hacer un tanteo previo con 100 gramos de leche para averiguar la cantidad necesaria

para toda la que hayamos de preparar; verificar la precipitación con los $^{9}/_{10}$ de la cantidad hallada y concluirla añadiendo el ácido restante gota a gota. Para evitar este inconveniente creemos preferible el empleo del Cl_2Ca.

Los *medios de Barsiekow* se ajustan a la siguiente fórmula:

Agua.....	100	cent. cúb.
Nutrosa.....	1	gramo.
Cloruro de sodio.....	0'50	—
Glucosa o lactosa.....	1	—
Tintura de tornasol.....	0'5	—

El *de Rothberger* consta de agar glucosado al 1 por 100 con el 1 por 100 de una disolución de rojo neutro al 1 por 100 también.

El cuadro de Falcó de las páginas 348 y 349 resume los caracteres diferenciales de los distintos microbios de este grupo y el siguiente los de bacilos disentéricos.

Disenterías.	Indol.	FERMENTACIÓN		AGLUTINACIÓN			Toxicidad.
		Manita.	Maltosa.	Suero Shiga.	Suero Flexner.	Suero Hiss.	
Shiga.....	0	0	0	+	0	0	Muy alta.
Flexner...	+	+	+	0	+	+	Escasa.
Hiss Y.....	+	+	0	0	+	+	Escasa.

	Movilidad.	Indol.	Patata.	Leche.	Suero lácteo tornasolado (medio de Petruschky).	Ag gluc al net
Bacilo tifoideo.....	Muy móvil; flagelos periféricos	No da indol.	Cultivo delicado y casi invisible.	Invariable.	Transparente y rojo violeta.	Inv
Bacilo paratifoideo A.	Muy móvil.	Idem.	Idem.	Idem.	Idem.	y
Bacilo paratifoideo B..	Muy móvil.	Idem.	Cultivo espeso, parduzco.	Idem; a los diez o doce días se transparenta el cultivo con tono parduzco.	Rojo, ligeramente turbio, cambio tardío en azul, velo en la superficie.	y
Bacilo enteritidis Gärtner...	Muy móvil.	Idem.	Idem.	Idem.	Rojo violeta; cambio rápido en azul y velo espeso en la superficie.	G y c
Colibacilo...	Poco móvil.	Da indol.	Idem.	Coagula enérgicamente.	Muy turbio y rojo intenso.	G y c
Paracolibacilos.....	Móvil.	Da indol.	Idem.	Invariable o coagulación escasa y tardía.	Idem.	Ga y fl ce
Bacilo fecalis alcaligeno.....	Móvil; flagelos uni o bipolares.	No da indol.	Idem.	Como el paratífico B.	Fuertemente azul, velo en su superficie.	Inva ble

...ar ...ado ...sub- ...tato ...lomo.	Colonia en medio de Drigalski.	Colonia en medio de Endo.	Caldo lactosado tornasolado con tubito de fermentación.	MEDIOS DE BARSIEKOW		
				Lacto-sado.	Gluco-sado.	Mani-tado.
...egreci-...nto; no ...gases.	Pequeña, delicada, azul y tra sparente.	Transparente e incolora.	Invariable.	Invariable.	Enrojecimiento; algunas veces coagulación.	Enrojecimiento.
...es sin ...grecimiento.	Como el bacilo tifoideo.	Idem.	Idem.	Idem.	Enrojecimiento y coagulación.	Enrojecimiento y coagulación.
...egreci-...ento y ...ases.	Como el bacilo tifoideo; colonia algo mayor y jugosa.	Idem.	Idem.	Idem.	Idem.	Idem.
...dem.	Como el bacilo paratifoideo B.	Idem.	Idem.	Idem.	Idem.	Idem.
...ases y ...egreci-...ento variable.	Colonia grande, roja y opaca.	Opaca roja; a veces con brillo metálico.	Rojo; enérgica producción de gases.	Enrojecimiento y coagulación de la nutrosa.	Idem.	Idem.
Idem.	Colonia azul y violeta algo opaca.	Incoloras o rojizas.	Invariable o tardíamente rojizo, con o sin producción de gases.	Enrojecimiento ligero o invariable.	Idem.	Idem.
...No da gases y ...ennecimiento variable.	Como el bacilo tifoideo.	Transparente e incolora.	Invariable o azul intenso.	Invariable o azul intenso.	Algunas veces enrojecimiento; casi siempre azul intenso.	Invariable o azul intenso.

4.° Bacterias Gram-negativas capsuladas, tipo pneumobacilo de Friedländer.

En este grupo incluimos el pneumobacilo, los bacilos del rino-escloroma y del ozena y el lactis aerogenes.

Se tiñen y cultivan bien por los procedimientos ordinarios, mostrando cápsulas, en las coloraciones intensas y por los métodos apropiados, en los productos patológicos y en los cultivos en leche y suero. Fermentan intensamente todos o casi todos los carbohidratos, con producción de gran cantidad de gases, de los cuales los dos tercios son H_2 y el resto CO_2. Como esta propiedad ofrece algunas variantes entre los distintos microbios del grupo, empieza a ser estudiada por los bacteriólogos para diferenciarlos, habiendo propuesto Perkins su distribución en tres grupos, según que fermenten todos, aerogenes de Migula, todos menos la lactosa, pneumobacilo, rino-escloroma y ozena, y todos menos la sacarosa, lactis aerógenes. El del rino-escleroma se diferencia del pneumobacilo por la falta de gases en la fermentación de la dextrosa.

Las reacciones biológicas son inseguras.

5.° Bacterias Gram-negativas del grupo de la septicemia hemorrágica.

Hállase formado por el bacilo productor de la peste bubónica, el pseudotuberculoso de los roedores y los de las septicemias del conejo, del cerdo, aves, etc.

Se tiñen bien con todos los colorantes, y en todos muestran tendencia a la coloración más marcada de las extremidades o coloración bipolar, pero se pone mejor de manifiesto esta propiedad fijando las extensiones uno o cinco minutos en alcohol absoluto, vertiendo el exceso de alcohol y quemando el resto para que se añada la fijación por el calor; la coloración se hará con azul de Lœffler y en caso de ser tan intensa que tienda a hacer desaparecer el espacio intermedio, decolórase ligeramente con ácido acético al 0'5 por 100.

Se cultivan bien en todos los medios, a la temperatura de 30°,

siendo lento el crecimiento. En los cultivos en caldo se favorece la clásica formación de estalactitas por adición de unas gotas de aceite o parafina líquido, para que faciliten la suspensión. La producción de formas involutivas se favorece por el cultivo en agar con sal al 3 por 100, pero hay que evitar la desecación del medio, pues sumándose ambas acciones apenas crece el microbio.

Tratándose de microbios productores de septicemias, es en la sangre donde *debemos buscarlos* preferentemente; pero, a diferencia de las septicemias producidas por cocos y el bacilo de Eberth, suele ser tan grande la cantidad de microbios que circulan con la sangre, que se les ve muy bien en las preparaciones directas. También se encuentran en gran cantidad en el jugo de los bubones, en los esputos de las formas pneumónicas, siendo, por el contrario, muy difícil el hallazgo en el pus de los bubones supurados.

El aislamiento se verifica por extensión con agotamiento en placas de agar común, no ofreciendo dificultad generalmente. Cuando se trate de encontrar el bacilo pestoso en cadáveres en putrefacción, se aconsejan los cultivos a 4°, temperatura a que se desarrolla casi exclusivamente el bacilo pestoso, pero es preferible apelar en este caso, como cuando se trate del diagnóstico del primer enfermo, a la inoculación percutánea en el conejillo de Indias; para ello se rapa y limpia un pequeño espacio de la piel del vientre, que se frota con el material sospechoso. El animal inoculado será colocado en cilindros de cristal, de más de 20 centímetros de altura, tapados con rejillas metálicas que impidan el paso de las pulgas, o en jaulas especiales, a prueba de pulgas, no debiendo olvidarse que si la simple conservación de cultivos pestosos vivos es peligrosa, la experimentación en los animales lo es mucho más, exponiendo a gravísimas epidemias; por esta razón tales trabajos no deben realizarse, sino en laboratorios especiales bien dispuestos y con permiso y vigilancia de las autoridades sanitarias. Háyanse sembrado las placas directamente con el producto patológico o con la sangre del animal inoculado, examínense las placas a las veinticuatro y cuarenta y ocho horas: primero a simple vista y después con el microscopio, siendo muy frecuente el hallazgo de colonias aislables por este proce-

dimiento a las doce o veinticuatro horas, cosa muy importante para la precocidad del diagnóstico.

La identificación de los gérmenes aislados comprenderá los caracteres morfológicos y biológicos y, en especial, la inoculación a los animales correspondientes y las reacciones biológicas.

Más dificultades presenta el aislamiento e identificación de los gérmenes en las epizootias de las ratas y roedores en general; frecuentemente se encuentran formas de peste crónica que apenas se delatan por pequeños engrosamientos ganglionares, congestiones y abscesos, en los que sólo se encuentra el germen por la inoculación al conejillo de Indias y, por otro lado, existen lesiones muy semejantes a las pestosas lentas o crónicas, determinadas por el bacilo pseudotuberculoso de los roedores, con tales analogías con el bacilo pestoso, que, en ocasiones, sólo un estudio muy detenido y preferentemente los caracteres histológicos y el resultado de la inoculación percutánea, permitirán una conclusión definitiva.

6.° Bacterias Gram-negativas hemoglobinófilas, tipo bacilo de Pfeiffer.

Incluímos en este grupo los bacilos hallados por Pfeiffer en los enfermos de influenza, por Koch Weeks en la conjuntivitis aguda epidémica, por Morax-Axenfeld en la conjuntivitis subaguda, por Nedden en ciertas úlceras corneales, por Bordet Gengou en la tos ferina y por Ducrey en el chancro blando.

Se *tiñen* débilmente, siendo conveniente colorear con fuchina fenicada al $^1/_{10}$ o azul Lœffler y prolongar la acción suficientemente o calentar; sobre todo, para la coloración del Pfeiffer en los esputos de los enfermos de influenza, es conveniente no perder de vista que el intenso teñido de los microbios añadidos al esputo por el moco faríngeo y bucal, así como la dilución del moco bronquial, portador del bacilo, producida por la mezcla, dificultan el hallazgo, y por último, que la misma presencia del moco que envuelve los microbios dificulta la penetración de los colores, pudiendo quedar sin teñir si es grande la cantidad de moco. Para evitar en lo posible estos

inconvenientes, recójanse los esputos después de un lavado cuidadoso de la boca y faringe, en una placa con agua esterilizada; hágase un primer lavado, recójase con las agujas las porciones más espesas y se llevarán a otra placa con agua estéril; si todavía es grande la carga de otros microbios, háganse nuevos lavados hasta que veamos notablemente reducido su número; entonces llévese al porta-objetos una pequeña porción y verifíquese una verdadera disociación con la aguja de platino para que la capa de moco sea lo más fina posible, fíjese por el calor y tíñase por el Gram con coloración secundaria con la fuchina fenicada al $^1/_{10}$, pues aun cuando estos microbios son Gram-negativos, se tiñen mejor después de la acción del Gram, que parece actuar de mordiente. En la tos ferina búsquese en la exudación bronquial de los primeros días y en el chancro blando en el raspado de la úlcera después de un lavado abundante y desinfección superficial.

Se *cultivan* mal en los medios comunes, sobre todo recién aislados, debiendo ser cultivados en medios con sangre o hemoglobina. Se necesita poca cantidad de esta substancia para que crezcan, bastando extender sobre la superficie del agar, con el asa de platino, una gota de sangre humana, de paloma o de conejo para que se desarrollen con la tenuidad que es característica en ellos. También crecen en los medios con sangre incorporada durante la preparación y en los medios con suero, si, como ocurre con frecuencia, tiene en disolución algo de hemoglobina.

Se le *encuentra* en los productos patológicos indicados, extendiendo con las precauciones marcadas a propósito de la coloración en agar sangre.

Para la *identificación* nos basaremos en la procedencia y caracteres morfológicos y biológicos.

7.° Bacterias Gram-positivas del grupo diftérico.

Comprende el diftérico, el pseudodiftérico de Hoffmann, el del xerosis conjuntival y otros pseudodiftéricos o difteroides, saprofitos mal definidos.

Se *tiñen* bien con todos los colorantes, pero si queremos

que aparezca su morfología con la mayor claridad, utilizaremos el azul alcalino de Lœffler.

Para la demostración de los *granos metacromáticos* empléase:

Método de Neisser. — 1.° Coloración durante un segundo por una mezcla de dos partes de:

Azul de metileno (medicinal Höchst)...	1	gramo.
Alcohol absoluto.....	20	cent. cúb.
Agua destilada.....	1.000	—
Ácido acético glacial.....	50	—

y una parte de:

Cristal violeta Höchst.....	1	gramo.
Alcohol absoluto.....	10	cent. cúb.
Agua destilada.....	300	—

2.° Lavado en agua.

3.° Coloración de fondo con una disolución de crisoidina en agua hirviendo al 1 o 2 por 300, o con una disolución de vesubina al 1 o 2 por 1.000, tres segundos.

4.° Lavado en agua.

Las granulaciones aparecen de color azul casi negro sobre el bacilo teñido de amarillo por la crisoidina o pardo-amarillento por la vesubina. El primer colorante debe ser preparado en el momento de usarlo, y de las dos disoluciones que se mezclan, la segunda se conserva bien, pero la primera, que es la más importante, hasta el punto de que se puede prescindir de aquélla, al envejecer pierde gran parte del ácido acético y no funciona bien. La coloración de fondo se prolongará lo debido para que se tiña el cuerpo de los microbios. Deben preferirse cultivos de diez a veinte horas, pero será bueno investigar en cada caso cuál es el momento preferible para el teñido. Frecuentemente las granulaciones metacromáticas aparecen claramente con el método de Gram y aun con el azul de Lœffler.

Se *cultiva* de preferencia en suero de Lœffler (pág. 255) y en caldo preparado con carne puesta en maceración veinticuatro horas para destruir los carbohidratos y dificultar la for-

mación de ácidos; las vasijas deben permitir que la capa de líquido tenga poco espesor y gran superficie.

Se *encuentran* en las pseudomembranas diftéricas y exudados faríngeos, nasales, conjuntivales y de las úlceras, según las localizaciones.

Para el *aislamiento* se extraen las falsas membranas o los exudados por medio de una varilla metálica recta, provista en su extremo de una escobilla de algodón; la varilla preparada se introduce en un tubo de cristal y se la sujeta en su eje mediante el tapón de algodón atravesado por ella; esterilizado todo al autoclavo, está presto a servir. Para obtener productos de la faringe, se deprime la lengua con la mano izquierda, mientras que con la derecha se frotan las falsas membranas o el moco depositado sobre la lesión sospechosa con la escobilla de algodón. En los casos de difteria nasal introduciremos la varilla recta por el orificio nasal y procuraremos tomar el material de la parte más posterior, y después, doblando la extremidad algodonada, tomaremos el moco de la rinofaringe, según dijimos a propósito del meningococo.

Con el exudado extraído haremos por lo menos tres extensiones, que teñiremos por los métodos Lœffler, Gram y Neisser, y después sembraremos el material restante en tubos, y mejor en placas de Petri con suero Lœffler, por el procedimiento de extensión con agotamiento. Examínense las siembras desde las doce horas, y en cuanto aparezcan colonias sospechosas háganse resiembras; si no aparecieran colonias sospechosas, háganse preparaciones por impresión (pág. 292) si se emplearon placas.

Para facilitar el hallazgo de las colonias del bacilo diftérico en las placas de suero, Conradi aconseja el siguiente medio:

Agua.....	1.000 cent. cúb.
Extracto de carne.....	10 gramos.
Sal común.....	5 —
Peptona.....	20 —
Bimalato cálcico.....	6 —

Se cuece durante media hora y se filtra, añadiendo después el 1 por 100 de glucosa. Una parte de este caldo se mezcla con tres de suero de buey, se agregan a cada 100 cent. cúb. de la

mezcla 2 cent. cúb. de una disolución de telurato potásico al 1 por 100. Coagúlese como el suero Lœffler y sométasele después a 85° un cuarto de hora.

Las colonias del bacilo diftérico reducen la sal de teluro, resultando completamente negras, mientras que los demás microbios que no tienen igual poder reductor, producen colonias pardas, grises o blancas. Puesto que algunos cocos y otros microbios de la faringe tienen un poder reductor tan intenso, como el diftérico, el medio carece de la especificidad que se supuso en un principio, no facilitando el aislamiento mucho más que el suero Lœffler, pero puede emplearse como medio diferencial entre el diftérico y pseudodiftérico.

La identificación de los microbios de este grupo no ofrece grandes dificultades por lo acusado de sus caracteres morfológicos, pero no ocurre lo mismo con la diferenciación entre los microbios del grupo, que se basa de ordinario en los siguientes caracteres:

Acción patógena. — Inocúlase al conejillo de Indias de 200 gramos, subcutáneamente en la piel de la pared anterior del pecho, un asa de un cultivo de veinticuatro horas, 37°, en suero Lœffler o de 0'2 a 1 cent. cúb. de cultivo en caldo de la misma fecha; el animal mostrará desde las veinticuatro horas un edema más o menos intenso en el sitio de la inoculación y morirá a los dos o tres días, mostrando en la autopsia el edema hemorrágico local, enorme congestión de las cápsulas suprarrenales y derrame pleurítico, encontrándose muy escasos microbios solamente en el edema local.

Si el microbio sólo produce edema local, sin llegar a matar al conejillo de Indias, inyéctense dos conejillos, uno con la cantidad dicha de microbios y otro con la misma y con 0'2 centímetros cúbicos de suero antidiftérico de 200 unidades antitóxicas o más. Si se trata del bacilo diftérico atenuado, el primer animal tendrá edema y el segundo no; si el aislado es un pseudodiftérico, presentarán edema ambos conejillos.

Fermentación de los carbohidratos. — El bacilo diftérico fermenta seguramente la glucosa, galactosa y levulosa, y la dextrina, el pseudodiftérico de Hoffmann, no fermenta ninguna, y el del xerosis fermenta los mismos que el diftérico, pero no fermenta la dextrina. Para poner de manifiesto estas diferencias, sobre

todo en lo que a la glucosa y levulosa se refiere, utilízanse los siguientes medios:

Medio líquido de Thiel:

Peptona	1	gramo.
Nutrosa	1	—
Glucosa	1	—
Sal común	0'5	—
Tornasol Kahlbaum	5	cent. cúb.
Agua	100	—

La fermentación se caracteriza en este medio por el enrojecimiento del tornasol y la coagulación de la nutrosa.

Medios sólidos de Rothe:

90 partes	Suero de buey o ternera.	4	partes.
	Caldo neutro	1	—
y			
10 partes (esterilizado).	Tornasol Kahlbaum	10	partes.
	Azúcar a ensayar	1	—

Mézclese y coagúlese al calor en tubos o placas de Petri; el diftérico vira al rojo, el medio con glucosa o levulosa, el de Hoffmann no.

Formación de ácidos. — Las grandes diferencias que existen en la fermentación de la glucosa entre el diftérico y pseudodiftérico de Hoffmann, se revelan con más precisión todavía, titulando la acidez producida en los cultivos en caldo sin macerar, para que conserve la cantidad necesaria de carbohidratos. Para verificar la titulación, se siembran varios tubos con 10 centímetros cúbicos cada uno y otros se dejan sin sembrar; a las veinticuatro horas se verifica la operación con disolución $^1/_{10}$, $^1/_{20}$ o $^1/_{40}$ normal y disolución alcohólica de fenolptaleína como indicador, en tubos sembrados y sin sembrar; hállese la media y véase la diferencia. El bacilo de Hoffmann forma menos de 0'4 de disolución, $^1/_{10}$ normal de ácido y el diftérico entre 0'4 y 1.

Producción de toxina. — En caso de necesidad, complétese la diferenciación comprobando si existe toxina diftérica, en cultivos en caldos de una a cuatro semanas, filtrados por bujía o matados con toluol, mediante la inoculación de cantidades distintas al conejillo de Indias.

8.° Bacterias Gram-positivas ácido-resistentes. Tipo bacilo tuberculoso.

Encierra este grupo el bacilo tuberculoso, el de la lepra, el saprofito encontrado por Alvarez y Tavel en el esmegma prepucial y otros semejantes, encontrados en el sebo cutáneo, secreciones interdigitales, cerumen, sarro dentario, moco nasal, en gangrenas, líquidos pleuríticos y sangre abandonados, en cadáveres, en la leche, en la manteca, en el estiércol, etc.

Bacilo tuberculoso. — Teñido. — Se basa en la propiedad que tienen estos microbios, de teñirse difícilmente por los colores de anilina, pero resistir con tenacidad a la decoloración.

Método de Ziehl-Neelsen. — 1.° Coloración durante dos a diez minutos con la fuchina fenicada (pág. 205), calentando hasta la emisión de vapores.

2.° Viértase el color excedente y lávese.

3.° Decoloración con ácido nítrico al tercio o ácido sulfúrico al cuarto. La decoloración debe continuarse hasta que después de lavada la preparación quede de un color rosa pálido.

4.° Coloración de fondo con la disolución acuosa concentrada de azul de metileno, con el azul Lœffler o con cualquier otro color azul.

En vez de la fuchina fenicada puede emplearse la anilinada, así como otros colores de anilina, con la precaución de usar para la coloración de fondo tonos rojos, fuchina, safranina o pardo Bismark, si se tiñen de los bacilos con colores violetas o azules, violeta de genciana, etc.

La decoloración se puede verificar también con alcohol, dato importante para diferenciar dentro de los *ácido-resistentes,* los que son *alcohol-resistentes* de los que no lo son, o comenzar la decoloración con el ácido y acabarla con el alcohol; según Kühne, con el aceite de anilina con ácido clorhídrico al 2 por 100, terminando con el alcohol.

Algunos métodos, como los de Frænkel y Gabbet, verifican la decoloración y teñido de fondo en unos segundos, empleando una disolución de 2 gramos de azul de metileno, en 100 centímetros cúbicos de ácido sulfúrico al cuarto. Aunque esta manera de proceder proporciona buenos resultados, como no su-

pone apenas economía de tiempo, y en cambio, se verifica la decoloración a ciegas, nosotros recomendamos realizar las operaciones separadamente.

Coloraciones granulares. — El bacilo de Koch contiene en su espesor una o más granulaciones (rara vez pasan de cinco), muy semejantes por su forma y distribución, preferentemente polar o en el centro del microbio, a las del bacilo de Lœffler, de los cuales, sin embargo, se diferencian por poseer, al igual que el propio bacilo de la tuberculosis, la propiedad de ser ácido-resistentes.

Con los métodos corrientes de coloración, como el Ziehl-Neelsen, estos granitos no se ven más que cuando se tiñen cultivos viejos o en algunos esputos de antiguos cavitarios, apareciendo en los demás casos el lugar que ocupan en el eje protoplasmático como un espacio claro que a veces da al bacilo aspecto discontinuo o teñidos en rojo, que no se destaca del color que toma el resto de la bacteria, por lo cual se han ideado diversos métodos para ponerlos en evidencia. El fundamento de la mayoría de ellos estriba en teñir con fuchina, violeta, etc.; hacer actuar el Lugol y decolorar después con los ácidos.

Método de Much. — 1.° Teñido previa fijación de la extensión durante un cuarto de hora haciendo hervir el colorante, o veinticuatro horas a 37° con violeta de metilo 6 B en solución alcohólica saturada, 10 cent. cúb.; agua fenicada al 20 por 100, 90 cent. cúb.

2.° Lugol, uno a cinco minutos.

3.° Acido nítrico al 5 por 100, un minuto.

4.° Acido clorhídrico al 3 por 100, unos segundos.

5.° Decolorar con alcohol-acetona, lavar, secar.

Para obtener buenas preparaciones, sobre todo si se trabaja con material patológico, es preferible teñir veinticuatro horas a 37° que hacer hervir, porque aparecen de este modo precipitados con frecuencia. Las granulaciones se tiñen en violeta obscuro; el cuerpo, en violeta muy claro o queda incoloro.

Método de Weiss. — Mezclando una parte de violeta de Much con tres partes de fuchina de Ziehl y procediendo en los demás tiempos como en el de Much, se obtienen bellas preparaciones. El cuerpo del bacilo se tiñe en rojo y las granulaciones más apetentes por el violeta de este último color.

Método de Betehg. — 1.° Teñir con fuchina cinco minutos en caliente.

2.° Lavar y teñir a continuación con: dalia, 2 partes; alcohol de 96°, 20; agua, 50; ácido fénico, V gotas.

3.° Lavar y Lugol, unos segundos.

4.° Diferenciar en alcohol.

Bacilos rojos, granos negros.

Método de Blanco. — 1.° Teñir con fuchina de Ziehl (1) durante cinco minutos después de haber calentado hasta abundante desprendimiento de vapores.

2.° Decolorar con alcohol clorhídrico al 3 por 100 (alcohol de 90°, 97 cent. cúb.; ácido clorhídrico comercial, 3 cent. cúb.) hasta que el frotis tenga color rosa, lo que se obtiene en unos segundos o medio minuto.

3.° Lavar abundantemente.

4.° Diferenciar con una solución acuosa al 1 por 100 de Orange I (Tropeolina 000, núm. 1) durante cinco minutos. (Solución de Orange se prepara tomando 1 cent. cúb. de una solución acuosa saturada y añadiéndolo a 99 de agua común).

5.° Lavar y secar.

El bacilo aparece en rojo, las granulaciones en rojo más obscuro, casi negras.

Cultivos. — Se cultiva en los medios ordinarios, caldo, agar, suero, patata, etc., adicionados de un 4 por 100 de glicerina, a 37°, protegiendo los tubos de la desecación mediante capuchones de goma. Las siembras deben hacerse frotando fuertemente la superficie de los medios sólidos en el asa bien cargada de material o depositando en la superficie de los medios líquidos una gran porción del velo de otro cultivo líquido por medio de un asa de platino grande o de la costra de un cultivo sólido desprendida con la espátula lanceolar perforada, de platino. Las siembras se harán tan pronto como los cultivos hayan alcanzado pleno desarrollo, pues si se aguarda mueren muchos de los microbios, exponiéndonos a la esterilidad completa.

(1) La fuchina de Ziehl se preparará cuidadosamente empleando la marca Grübler fb, por su gran poder de impregnación para los granos. La fuchina cuanto más vieja va mejor.

Medio de patata de Turró. — 250 gramos de patata holandesa bien molida, es decir, transformada en pulpa, se pone en un litro de agua glicerinada al 5 por 100, se macera una hora en autoclavo a 110°, se deja sedimentar en probetas y el líquido se filtra por papel o algodón, repartiéndolo en matraces de gran superficie. Con este caldo se puede preparar agar.

Medio de huevo de Dorset. — Dos huevos lavados con jabón, esterilizados en su cubierta con alcohol y enjuagados con agua estéril, se recogen en una vasija y se baten bien, procurando que no se forme espuma. Tres partes de los huevos batidos se mezclan con una de caldo glicerinado al 5 por 100 sin neutralizar y se distribuye en tubos, que son esterilizados tres días consecutivos a 70°, y el último a 80°, o un solo día a 100° durante dos horas. El calentamiento se hará en posición inclinada, como en el tendido del suero y del agar.

Medio de cerebro de Ficker. — Cerebro desmenuzado y agua a partes iguales, se cuecen un cuarto de hora, agitando, y después se cuela; la masa que atraviesa el colador se mezcla con el mismo volumen de agar al 2'5 por 100 y se añade a la masa total el 3 por 100 de glicerina; esterilícese el medio distribuído y procúrese que la solidificación sea rápida para que no se separe el cerebro por decantación.

Medio de Hesse.

Sal común	5 gramos.
Glicerina	30 —
Agar	10 o 20 —
Disolución normal de soda	5 —
Agua destilada	950 cent. cúb.

Añádanse 5 gramos de nutritivo Heyden, disueltos en 50 gramos de agua destilada, cuézase todo, agitando durante quince minutos y fíltrese. Repártase y esterilícese.

Investigación del bacilo en los productos patológicos.—*Esputos.* Pueden examinarse los esputos en los pocillos especiales de porcelana con una mitad ennegrecida, a fin de observarlos sucesivamente en fondo blanco y negro, pero resulta más cómodo ponerlos en una placa de Petri, que se puede colocar sobre papel blanco o negro; examinados de esta manera, se

buscan las porciones más densas, tomando pequeñas porciones, con el asa de platino, para hacer las preparaciones.

Deben repetirse los ensayos, pues fácilmente se comprende que las partes cargadas de bacilo se mezclan con otras que no tienen, y sólo a fuerza de ensayar con distintas porciones tendremos la casi seguridad de encontrar los bacilos, si los hay. Las preparaciones deben ser examinadas con paciencia, porque si los bacilos no son muy abundantes, probablemente habremos de recorrer grandes superficies para encontrarlos.

Para evitar estos inconvenientes, se apela a la *homogeneización*. Uno de los más sencillos procedimientos es el de Biedert, modificado por distintos autores; consiste, en esencia, en mezclar los esputos con 2 a 10 volúmenes de lejía de sosa, agitando hasta que estén bien homogeneizados; se les cuece en una cápsula de porcelana y después se añade una gota de la disolución alcohólica de fenolptaleína, y tantas de ácido acético al 5 por 100 como sean necesarias para que desaparezca el color producido; a continuación, se rebaja la densidad para que los microbios puedan precipitarse, añadiendo dos veces su volumen de alcohol de 96 por 100, o como quieren Besançon y Philibert, tomando la densidad y, si llega a 1.004, agregando tanto alcohol al 50 por 100 como sea necesario para volver la densidad a 1.000; finalmente, se decanta o centrifuga el esputo así preparado y con el sedimento se hacen las preparaciones.

El procedimiento de la antiformina de Uhlenhut, ofrece la ventaja de disolver los demás microbios al mismo tiempo que la mucina y se practica mezclando 20 cent. cúb. de esputo con 65 de agua destilada y 15 cent. cúb. de antiformina; se tiene la mezcla una hora a 37°, agitando de cuando en cuando; al cabo de este tiempo se sacan 10 cent. cúb. del sedimento o porciones profundas con una pipeta o jeringa, se ponen en un tubo de centrífuga y se centrifuga; se separa el líquido, se añade solución salina isotónica, se centrifuga de nuevo, se vierte y se repite este lavado varias veces; con el sedimento se hacen las preparaciones, mezclando con un poco de líquido albuminoso si no adhiere al cristal. Este procedimiento se puede combinar con el de la ligroina, de acuerdo con Jacobson, mezclando el líquido homogeneizado, según las indicaciones anteriores, con la cantidad necesaria de ligroina, para que for-

me una capa de 2 centímetros; agitando y dejándolo en reposo, se separa la ligroina que asciende llevando consigo diferentes corpúsculos y los bacilos que suelen quedar entre el líquido y la ligroina, de donde cogeremos el material.

En el procedimiento de Spengler se utiliza la acción digestiva de la pancreatina; se mezclan los esputos con volumen igual de agua caliente, se alcalinizan ligeramente, se añade de 1 a 2 por 100 de pancreatina, se mezcla bien y se lleva todo a la estufa a 37°, dos o tres horas, centrifugando después para emplear el sedimento. Este procedimiento parece disolver, como el anterior, algunos de los microbios comunes y es recomendado para preparar las siembras directas.

Orina.—Lo mismo que la leche y otros líquidos, se examinan en el sedimento de la centrifugación, rebajando la densidad si fuera preciso hasta 1.000.

Aislamiento.—Aunque se puede intentar el aislamiento directo de los productos patológicos después de someterlos a los tratamientos indicados anteriormente, como el bacilo tuberculoso crece lentamente y en las primeras siembras le cuesta adaptarse a los medios artificiales, casi siempre es invadido el terreno por los demás microbios antes de que haya la menor señal del desarrollo del bacilo tuberculoso. Por esta razón el aislamiento va precedido constantemente de la inoculación al conejillo de Indias, como medio de purificación.

El sedimento de los productos homogeneizados se inyecta subcutáneamente en la piel de la cara interna del muslo de dos o tres conejillos o se deposita en una bolsa subcutánea si es muy denso; el sitio de la inoculación cicatriza rápidamente, como no se sume la acción patógena de otros microbios; de los siete a los quince días se produce el infarto ganglionar, en la pléyade correspondiente al sitio de la inoculación; en este momento, si necesitamos un juicio precoz por haber resultado negativo el examen microscópico o queremos obtener pronto los cultivos, con todas las precauciones asépticas de una intervención quirúrgica, extraeremos uno de los ganglios engrosados y con él haremos el examen histológico y las siembras. Si no tenemos prisa se aguarda a que el animal sucumba, a las cuatro u ocho semanas; se practica la autopsia con el mayor cuidado y se extraen trozos de los órganos en que las lesiones tuberculosas sean más evidentes y se guardan en cápsu-

las de Petri, esterilizadas, hasta la terminación de la autopsia.

Tritúrense las lesiones en un mortero y con la pulpa háganse las preparaciones necesarias para comprobar la existencia del bacilo; una vez demostrada la presencia, cárguese el asa de platino con buena cantidad de pulpa y frótese con ella enérgicamente un tubo de suero glicerinado o medio de huevo; repítase la misma operación en una docena de tubos. Para evitar la pérdida absoluta del material si las siembras fracasasen, inocúlense otros dos conejillos.

Las siembras son examinadas los días siguientes para desechar todas las que se impurifiquen; desde los ocho a los catorce días aparecen las colonias tuberculosas, que se resembrarán en el mismo medio tan pronto como estén plenamente desenvueltas.

Identificación. — Los caracteres del bacilo tuberculoso son de tal modo acusados que bastan, en unión de la inoculación a los animales y el examen histológico de las lesiones, para su identificación, debiéndonos ocupar ahora solamente del modo de separarlo de los demás ácido-resistentes y distinguir sus variedades.

De los demás bacilos ácido-resistentes deben distinguirse dos grupos: el primero, formado por los que a la par son alcohol-resistentes, y el segundo, por los que sólo son ácido-resistentes, es decir, que prolongando la decoloración con el alcohol, después de comenzada por los ácidos, se decoloran por completo. Al primer grupo corresponden los bacilos encontrados en la manteca, leche, estiércol y otras materias; estos bacilos, que por sus propiedades colorantes son exactamente iguales al tuberculoso y hasta son algo virulentos para el conejillo de Indias, en el que provocan abscesos caseosos sin tendencia a la generalización y no transmisibles en serie por reinoculación, se diferencian notablemente por los cultivos, pues crecen muy bien en los medios comunes. Los que no resisten a la decoloración por el alcohol son los encontrados en el esmegma, en el sebo cutáneo, cerumen, moco nasal y productos en putrefacción, diferenciándose del tuberculoso, con el que no se puede confundir en los productos mencionados por dicho carácter, por la menor resistencia a la decoloración por los ácidos, por su teñido con los colorantes comunes y, finalmente, por su falta absoluta de acción patógena.

Las variedades humana y bovina del bacilo tuberculoso que podemos encontrar en las lesiones se diferencian en que la segunda es más gruesa, crece en los medios, formando velos más tenues, poco plegados y sin tendencia a ascender por las paredes de la vasija, y por su gran patogenidad para el conejo común.

Bacilo de la lepra. — Se tiñe más fácilmente que el tuberculoso, con los mismos métodos, decolorándose también mejor con los ácidos y el alcohol. Para diferenciarlos, Baumgarten ha propuesto el siguiente método: 1.°, coloración con disolución de fuchina (cinco a seis gotas de la disolución alcohólica saturada en un vidrio de reloj lleno de agua), de seis a siete minutos; 2.°, decoloración durante quince segundos en alcohol, con ácido nítrico al 1 por 10; 3.°, lavado en agua. Para los cortes sustituye el decolorante por alcohol solo; después aceite de cedro. El de la lepra se tiñe y el tuberculoso no.

Se cultiva muy difícilmente, siendo discutidos los resultados obtenidos hasta ahora, y no es patógeno para el conejillo de Indias.

9.° Actinomicosis.

Teñido. — Los granos amarillentos que salen en el pus procedente de las lesiones actinomicósicas, formados por las colonias del parásito, se tiñen empleando el método de Gram con coloración de fondo con eosina sobre extensiones obtenidas por aplastamiento en el porta de dichos gránulos, con desecación espontánea y fijación en alcohol y éter a partes iguales. El micelio que es Gram-positivo queda teñido en azul violado y las mazas aparecen de color rojo. También puede emplearse el método de Ziehl, pues el micelio es ácido-resistente, aunque con menos intensidad que el bacilo de Koch.

Las preparaciones verificadas con los cultivos de este microbio pueden ser teñidas con los métodos corrientes; en cambio, su teñido, fuera del método de Gram, que proporciona excelentes coloraciones en los cortes histológicos de las lesiones, requiere métodos especiales después de verificar la fijación e indu**r**ación en alcohol.

Método de Weigert. — 1.° Coloración de los cortes, por una a veinticuatro horas, en un líquido compuesto de

Solución concentrada de orsella en alcohol absoluto	20 gramos.
Ácido acético	5 —
Agua destilada	40 —

2.° Lavado rápido en alcohol.

3.° Coloración en solución de violeta de genciana en agua al 1 por 100.

4.° Lavado en alcohol.

5.° Aclaramiento en xilol, bálsamo.

Este procedimiento impregna la zona central de actinomices en azul y las mazas periféricas de rojo, mientras los núcleos del tejido inflamatorio quedan violados.

Método de Israel.—1.° Coloración durante varias horas en una disolución concentrada de orceína, acidulada con ácido acético.

2.° Lavado en agua.

3.° Póngase el corte sobre un porta y deséquese con papel chupón.

4.° Alcohol absoluto unos segundos, y nueva desecación con papel.

5.° Desecación completa al aire y montaje.

Cuando se pretende exclusivamente el teñido del parásito, puede prolongarse más la decoloración por el alcohol.

Método de Flormann, modificación de Kühne. — 1.° Coloración de los cortes en

Solución alcohólica de violeta de metilo	1 gramo.
Agua	2 —
Solución al 1 por 100 de carbonato de amoníaco	2 —

2.° Lavado, por algunos minutos, en agua abundante.

3.° Permanencia de cinco minutos en la solución yodo yodurada de Lugol.

4.° Nuevo lavado en agua.

5.° Decoloración, por veinte minutos, en alcohol con *fluoresceína* (1 por 100), que se mudará varias veces.

6.° Extracción de la fluoresceína en alcohol de 40°.

7.° Transporte y permanencia, por algunos minutos, en aceite de anilina.

8.° Esencia de lavanda para aclarar.

9.° Xilol y bálsamo.

Las fibras centrales del actinomices adquieren color azul obscuro, mientras las mazas periféricas permanecen incoloras o poco coloradas.

Cultivos. — Se obtienen en los medios comunes, sobre todo añadidos de suero o glicerina, sembrando las granulaciones amarillas del pus, observando los cultivos a los dos días para coger con el asa de platino las granulaciones en torno de las cuales no se hayan desarrollado colonias de otros microbios y transportarlas a nuevos tubos de cultivo. Practíquense siembras numerosas y póngase en aerobiosis y anaerobiosis.

10. Bacteria del muermo.

Se tiñe, aunque no muy intensamente, por los métodos comunes; de preferencia con los de Lœffler y Nicolle, y no toma el Gram.

Método especial de Lœffler. — 1.° Coloración en azul de Lœffler o violeta de genciana anilinado con una cantidad igual de disolución de potasa al 0'01 por 100, durante cinco minutos.

2.° Rápido lavado en ácido acético al 1 por 100, al que se ha dado color amarillo (de vino blanco) por la adición de una pequeña cantidad de tropeolina 00.

3.° Rápido lavado en agua destilada.

Coloca los cortes primero unos minutos en una disolución de potasa al 0'01 por 100, tiñe treinta minutos, hace el lavado rápido en 10 gramos de agua destilada con 2 gotas de disolución concentrada de ácido sulfuroso y 1 gota de ácido oxálico al 5 por 100. Después alcohol y aceite de cedro.

Método de Unna para los cortes. — 1.° Se secan los cortes sobre el porta y se tiñen diez minutos con el azul de Kühne.

2.° Lavado en agua.

3.° Coloración de quince minutos en disolución acuosa saturada de tanino, con una cantidad igual de disolución acuosa de fuchina ácida al 1 por 100.

4.º Alcohol y aceite de cedro. El azul tiñe los microbios y núcleos, y la fuchina ácida los plasmas.

Se cultiva en los medios ordinarios.

Se encuentra en las lesiones y en sus exudados, si bien el examen directo no da resultado con frecuencia.

Aunque se le puede *aislar* por extensión en placas, se acostumbra verificar previamente la inoculación al conejillo de Indias, que sirve a la par para su *identificación*.

La inoculación intraperitoneal mata al conejillo de Indias, produciendo la orquitis muermosa (signo de Strauss), que, sin ser patognomónica, es bastante característica en ocho o diez días; pero como los microbios asociados pueden determinar la muerte inoculados en el peritoneo, deben inocularse al mismo tiempo otros conejillos subcutáneamente y, mejor, inocular uno de este modo, y tan pronto como se hayan producido las adenitis extirpar los ganglios e introducirlos en el peritoneo de otro canejillo.

Con el pus peritoneal y testicular obtenido en la autopsia se hacen siembras por extensión con agotamiento en placas de agar y en tubos de patata, para comprobar la formación de la colonia característica.

Los trabajos con el bacilo muermoso y, sobre todo, las inoculaciones, son altamente peligrosas, no debiéndose practicar sino en laboratorios bien acondicionados y por quien tenga suficiente preparación.

11. Bacilo Gram-positivo de la pústula maligna.

Se *colorea* perfectamente con todos los colorantes y toma el Gram. Aplíquense los teñidos especiales de cápsulas a las extensiones de los distintos órganos en las autopsias y los de esporos a los cultivos que los posean en el examen previo en gota pendiente.

Se *cultiva* muy bien en todos los medios comunes, siendo características sus colonias en melena de león en la superficie de la gelatina y del agar y la punción en gelatina, y el aspecto de los cultivos en caldo.

Debe ser buscado en la serosidad de la pústula maligna, en

la sangre y en los órganos de los cadáveres. También se le puede encontrar en tierras, aguas y materiales contaminados.

El *aislamiento* se obtiene fácilmente por extensión con agotamiento en la superficie de placas de agar, aun en órganos que se encuentren en putrefacción; cuando se encuentra mezclado con gran cantidad de microbios saprofitos, algunos de los cuales suelen producir colonias bastante semejantes a las del antracis, como ocurre con algunas variedades de *mesentericus, micoides,* etc., se debe apelar a la inoculación al conejillo de Indias para obtenerle rápida y seguramente aislado. Si, por el contrario, encuéntrase mezclado con otros patógenos o saprofitos no esporulados, nos valdremos del calentamiento a 80° durante unos minutos, según hemos expuesto en el lugar oportuno.

Los caracteres morfológicos y cultivos de este microbio y, sobre todo, su acción patógena son tan marcados, que no ofrece dificultad alguna su *identificación* de los gérmenes aislados en caso de duda.

12. Bacilos anaerobios Gram-positivos. Tétanos, edema maligno, carbunco sintomático, botulismo, gangrena gaseosa.

Al describir la técnica especial de los microbios anaerobios hemos dicho la mayor parte de lo correspondiente a estos gérmenes. Todos se *tiñen* bien con los colorantes ordinarios, poniéndose de manifiesto por las coloraciones apropiadas los flagelos de los cuatro primeros, que son movibles, y los esporos de los cinco. Respecto a la movilidad será necesario observarla en anaerobiosis, pues con frecuencia se quedan inmóviles en cuanto se ponen en contacto con el oxígeno del aire; al resembrarlos, procederemos con rapidez para evitar la acción nociva del oxígeno; pero si los cultivos están esporulados, crecerán, a pesar de todo.

Se cultivan bien en los medios comunes; se encuentran al nivel de las lesiones, salvo el *bacillus botulinus,* que no crece a temperatura superior a 25°, debiéndose su acción patógena a una intoxicación por una toxina activísima desenvuelta en los alimentos en que vegeta el germen.

El *aislamiento* de las lesiones puede verificarse simplemen-

te por extensión con agotamiento o dilución previa en superficie; pero es mucho más rápido inoculando al conejillo de Indias, subcutánea o intramuscularmente. También se puede utilizar la circunstancia de tratarse de microbios esporulados para separarlos de los que no lo son y que con frecuencia les acompañan, como ocurre en el tétanos. El aislamiento de estos gérmenes de las tierras y otros materiales contaminados ofrece mayores dificultades, pues con frecuencia hállanse asociados varios de estos microorganismos, y siguen asociados en las lesiones que producen cuando son inoculados en los animales; de todos modos, bien por la extensión directa o por la inoculación, llegaremos a separarlos.

Lo mismo que en el bacilo de la pústula maligna, son tan acusados los caracteres de estos microbios, que en general será sencilla su identificación.

13. Vibriones. Cólera morbo asiático, cólera nostras.

La forma incurvada caracteriza los microorganismos de este grupo, y esta forma puede ser puesta de manifiesto por la *coloración* con los colorantes ordinarios, aunque debe utilizarse de preferencia los poco intensos, empleando la fuchina de Ziehl diluída al décimo, debiéndose tener en cuenta que la curvatura es muy variable y en ocasiones parecen rectos. El procedimiento de Zettnow y similares nos permitirá determinar si el vibrión objeto de nuestro estudio posee en el extremo uno o más flagelos. Compruébese, en gota pendiente, el movimiento activísimo y característico de los vibriones y, en especial, del colérico en forma de enjambre de mosquitos.

Se *cultiva* bien en los medios ordinarios; pero, en general, prefiere alguna mayor alcalinidad que los demás microbios, empleándose corrientemente el llamado agar alcalino y la gelatina alcalina, que contienen el 3 por 100 de la disolución de carbonato sódico cristalizado al 10 por 100, después de haberlos puesto, al punto neutro, al tornasol. Los cultivos más característicos son en gelatina, agua de peptona y agar alcalino.

Se *encuentra,* en enorme cantidad, en las diarreas riciformes de los coléricos, en las aguas contaminadas por ellas y más raramente en otras materias.

El *aislamiento* básase en su rápido crecimiento en la superficie del agua de peptona, y en su preferencia, para los medios algo alcalinos.

El *medio de Dieudonné* constituye un medio favorable para el aislamiento directo de los vibriones; consiste en la mezcla de volúmenes iguales de sangre de buey desfibrinada y lejía normal de potasa (56 por 1.000), adicionada al agar ordinario al 3 por 100, neutro al tornasol, en la proporción de 7 partes de agar y 3 de dicha mezcla; fórmase un medio rojizo fuertemente alcalino, en el que se desarrolla, en los días sucesivos, gran cantidad de amoníaco, debiéndose mantener las placas preparadas con este medio abiertas e invertidas, durante veinticuatro horas como mínimo, para que el amoníaco no dificulte el desarrollo de los vibriones.

La marcha a seguir con unas deposiciones sospechosas de cólera, consiste en:

1.° Examen de preparaciones de los copitos de moco, teñidas con la fuchina diluída. Examen de los movimientos en gota pendiente. Examen de una gota pendiente, confeccionada con agua de peptona y una mínima porción del material sospechoso después de una permanencia de media hora en la estufa a 37°, para favorecer la observación del vibrión por su crecimiento rápido.

2.° Siembra directa, por extensión, con agotamiento en la superficie de una serie de tres placas de agar alcalino y en otra de agar Dieudonné.

3.° Enriquecimiento en agua de peptona (1), sembrando seis tubos con un asa del material cada uno y 1 cent. cúb. en un matracito con unos 50 o 100 cent. cúb. de agua de peptona.

Las siembras en agua de peptona serán examinadas desde las seis horas de cultivo a 37°, recogiendo con el asa de platino el velo que se forme en la superficie o simplemente tocando la superficie del líquido si no hubiera, teniendo un gran cuidado para que los líquidos no se agiten en el momento de sacarlos de la estufa, y haciendo preparaciones teñidas con fuchina diluída y gotas pendientes. Si se observan vibriones, verifíquense

(1) Agua de peptona con 0'01 de nitrato potásico y 0'02 de soda cristalizada.

extensiones en series de placas de agar alcalino y Dieudonné, para su aislamiento; en caso contrario, repítase el examen a las doce, dieciocho y veinticuatro horas, verificando las siembras para aislamiento en cuanto se vean formas sospechosas; pero si a las veinticuatro horas no hemos visto nada positivo, verifíquense resiembras en agua de peptona, tomando siempre el material de la superficie, y déjense todas las siembras viejas y nuevas en la estufa a 37° hasta el día siguiente, en que repetiremos las observaciones. En este sentido debemos ser infatigables, no dejando de examinar todas las siembras efectuadas, pues frecuentemente se obtiene resultado positivo en una y no en otras, por la desigual repartición de los microbios en el material.

Las placas sembradas directamente y las sembradas con el agua de peptona, son examinadas después de veinticuatro horas de cultivo a 37°; de todas las colonias que nos ofrezcan la menor duda, haremos preparaciones teñidas y gotas pendientes, y por último, una aglutinación de orientación y resembraremos en tubos de agar alcalino y caldo todas las sospechosas, o de aglutinación positiva. Si no encontramos colonias sospechosas, dejaremos las placas en la estufa un día más y repetiremos la observación.

Para la investigación del vírgula del cólera en las aguas sospechosas de contaminación, mezclaremos un litro del agua en cuestión con 100 cent. cúb. de *agua de peptona concentrada.*

Agua	100	cent. cúb.
Peptona	10	gramos.
Sal	5	—
Nitrato potásico	0'1	—
Soda criat	0'2	—

Después de agitar la mezcla se distribuyen en diez matracitos de unos 200 cent. cúb. de capacidad esterilizados y se llevan a la estufa a 37°. Se prescinde, desde luego, del examen directo, por la relativa escasez de los gérmenes.

Se comienza el examen de los matracitos a partir de las seis horas, de modo semejante a como hemos descrito con el agua de peptona en el examen de las deposiciones diarréicas, y se

verifica el aislamiento en placas de agar alcalino y Dieudonné también de la misma manera, tan pronto como encontremos microbios sospechosos; en caso contrario, repítase el examen a las doce, dieciocho y veinticuatro horas, y en caso negativo, resiémbrese en agua de peptona, siempre de la superficie, pues con frecuencia se consigue el aislamiento con mayor facilidad en el segundo pase por el agua de peptona que en el primero.

Identificación del vibrión aislado.—Sobre todo en los primeros casos sospechosos ha de ser hecha con el mayor esmero, apelando a todos los caracteres necesarios, pues un error puede acarrear serias complicaciones y sólo afirmaremos encontrarnos en presencia del vírgula colérico si se trata de un vibrión monoflagelado, liquidante de la gelatina, con el característico aspecto de sus cultivos, dando la reacción del nitroso-indol, aglutinable hasta un título alto con el suero anticolérico, y, finalmente, respondiendo claramente de un modo positivo en las reacciones de Pfeiffer y de fijación del complemento.

14. Espirochete de la sífilis.

El diagnóstico bacteriológico de la sífilis básase en la comprobación del espirochete pálido de Schaudinn en las lesiones, en la reacción de Wassermann verificada con el suero de los pacientes y en la estructura histológica de las lesiones. Como los métodos histológicos aplicables a la demostración de las lesiones histológicas apenas discrepan de los empleados en el estudio de las demás lesiones descritos en la segunda parte, hemos de limitarnos, por ahora, a decir los métodos más corrientes para el hallazgo del espirochete en las lesiones y describir la técnica más perfecta para la reacción de Wassermann.

Teñido.—*En las extensiones.*—Las extensiones deben hacerse con la serosidad que exuda el chancro por compresión después de un cuidadoso lavado de la superficie, para eliminar los numerosos microbios superficiales y hacer que sea mayor la cantidad de espirochetes Para la fijación y teñido, empléese el método de Giemsa, tal como ha sido descrito en la página 135, tanto en el procedimiento lento como en el rápido y

todas sus modificaciones. Este método, con el que fué revelado el *Spirochaete pallida* por Schaudinn, colorea este microbio en rosa más o menos violáceo, aunque poco intenso, habiéndose propuesto por esta razón los siguientes procederes:

Davidson.—Fija primero diez minutos en el alcohol absoluto y tiñe treinta a sesenta minutos en una solución acuosa saturada de cristal violeta. Lava después en agua, deseca y examina un cubre-objetos. El treponema se revela en color violado.

Heixheimer-Hübner.—Fijan igualmente en alcohol absoluto, coloran veinticuatro horas en una disolución al 1 por 100 de azul Nilo (o Capri); después, igual. El treponema aparece azul.

Duggeon.—Fija veinte minutos en alcohol absoluto y tiñe media hora en la disolución al 1 por 100 del polvo Leishman. Lo demás, idéntico. El treponema se presenta morado.

Fusco.—Fija también en alcohol absoluto. Usa como mordiente ácido crómico al 5 por 100, durando cinco minutos. Después tiñe media hora con disolución acuosa saturada y caliente de violeta de genciana o de metilo recientemente filtrado. El resto, igual El treponema adquiere tono violeta.

Coloración del treponema en los cortes de órganos sifilíticos: *Bertarelli, Volpino y Boven.*—Fijan en alcohol absoluto y sumergen las piezas durante cuatro días en una disolución de nitrato de plata al 1'5 por 100, en partes iguales de alcohol (96°) y agua destilada, adicionando 5 gotas por 100 de ácido acético puro. Lavados repetidos. Usan después el reductor de Van Ermenghen: tanino, 3 gramos; ácido pirogállico, 5 gramos; acetato sódico, 10 gramos; agua destilada, 550 gramos; acción durante veinticuatro horas. Lavado abundante. Induración en alcohol e inclusión en parafina. Treponemas negros sobre fondo amarillo.

Método del nitrato de plata reducido.—Levaditi demostró primeramente que nuestro método del nitrato de plata reducido (4.ª fórmula ligerísimamente modificada) tiñe con gran constancia los treponemas en todos los órganos sifilíticos, destacando en negro sobre fondo amarillo.

He aquí cómo aplica dicho proceder Levaditi:

1.° Fijación de las piezas en formol, al 10 por 100, durante veinticuatro horas.

2.° Lavado en agua e induración en alcohol de 96°, por veinticuatro horas.

3.° Inmersión de las piezas en agua destilada hasta que caigan al fondo.

4.° Acción, por cinco días, del nitrato de plata al 1'50 por 100, mantenido en estufa a 38°.

5.° Lavado rápido de las piezas en agua destilada.

6.° Reducción de las mismas en la solución ordinaria de ácido pirogállico y formol (ácido pirogállico, 1; agua, 100; formol, 5).

7.° En fin, lavado, induración en alcohol, inclusión en celoidina o parafina, cortes, etc.

Perrin ha obtenido también buenos resultados empleando la fijación en alcohol amoniacal (fórmula 3.ª). Las más bellas preparaciones se logran en los órganos de los recién nacidos sifilíticos.

Proceder rápido de Levaditi Manouelian.—A fin de abreviar el tiempo de impregnación de las piezas en la estufa, estos autores han propuesto recientemente la siguiente modificación, que da también excelentes preparaciones:

1.° Fijado en formol, induración en alcohol y lavado como en la fórmula anterior.

2.° Inmersión de las piezas en:

Nitrato de plata al 1 por 100.....	100 gramos.
Piridina.....	10 —

Este baño con las piezas se mantendrán primero dos o tres horas a la temperatura ordinaria, y después, por cuatro o seis, en estufa a 50°.

3.° Lavado muy rápido en piridina al 10 por 100.

4.° Reducción, durante algunas horas, en un baño compuesto de:

Ácido pirogállico.....	1 gramo.
Agua.....	100 —
Acetona.....	4 —
Piridina.....	15 —

5.° Induración, inclusión y cortes. Los treponemas se presentan, como en la fórmula anterior, impregnados de negro.

Método de Eyenes y Sternberg. — 1.° Fijación en formalina al 10 por 100, y secciones lo más finas que sea posible en congelación o con inclusión en celoidina.

2.° Lavado en agua destilada e inmersión en disolución acuosa de nitrato de plata al 1 por 100 durante treinta o treinta y cinco minutos en la estufa de 37°, o más tiempo a la temperatura de la habitación en la obscuridad, siendo de importancia la duración de este período.

3.° Los cortes son colocados en la siguiente disolución hasta que se impregnen de color pardo obscuro, lo que se consigue en uno o dos minutos, agitando mientras se produce el precipitado:

Disolución acuosa de nitrato de plata al 2'5 °/₀	10	cent. cúb.
— — de gelatina (en caliente) al 10 °/₀...	10	—
— — de goma arábiga al 50 °/₀.....	10	—
— — de hidroquinona al 5 °/₀.....	5	—

Después de bien mezcladas las tres primeras disoluciones añádase la hidroquinona.

4.° Lavado de uno a dos minutos en disolución acuosa de hiposulfito sódico al 10 por 100.

5.° Lavado en agua, deshidratación, aclaramiento y montaje.

El aspecto de los tejidos y espirochetes es el mismo que en los demás métodos de plata. Con este método tíñense también en los cortes y en las extensiones un gran número de los microbios comunes, constituyendo un excelente método general para teñir bacterias en los cortes, según demuestran las preparaciones de Luna.

Técnica de la reacción de Wassermann. — Después de la extensión con que nos hemos ocupado de la reacción de fijación del complemento, de la que la de Wassermann no es más que un caso particular, sólo nos detendremos sobre las particularidades, remitiéndonos para todo lo demás a la página 327, donde aquélla fué descrita.

Antígeno. — Empléanse como antígenos extractos acuosos de hígado de feto sifilítico, poniéndolos a macerar después de reducidos a pequeños fragmentos, de modo que por cada parte del órgano haya cuatro de agua fenicada al 5 por 1.000; des-

pués de una maceración de veinticuatro horas o varios días, según que se active la maceración por medio de un agitador mecánico o no, se decanta, se centrifuga y se separa el líquido, que se envasa en recipientes adecuados. Los antígenos acuosos han caido en completo desuso y en la actualidad se emplean extractos alcohólicos desde el 1 por 4 al 1 por 30 en alcohol de 96° o absoluto, de órganos sifilíticos o hígado y con mayor frecuencia extractos de corazón de conejillo de Indias, de buey o humano, normales. Noguchi emplea como antígeno lo insoluble en acetona, después de tratar por el éter un extracto alcohólico. También se emplean extractos alcohólicos colesterinados.

Como en la clásica reacción de fijación del complemento, los antígenos deben ser cuidadosamente titulados para determinar, en primer lugar, la dosis que es capaz de fijar espontáneamente, a fin de utilizar la mitad de la dosis subfijadora, pero al mismo tiempo debe ponerse una serie de tubos completamente igual, mas sin complemento, con objeto de demostrar que las dosis de antígeno empleadas no son capaces de hemolizar sin la presencia del complemento. A continuación debe ser ensayado con suero sifilítico, comprobado anteriormente en otros antígenos, para averiguar su sensibilidad específica. Los antígenos bien preparados utilízanse generalmente a la dosis de 0'1 a 0'4 de cent. cúb., no debiendo ser utilizados cuando pasa de este límite. En caso de reacciones negativas no debe de prescindirse de repetir la reacción con antígeno de órganos sifilíticos.

Suero del enfermo. — Constituye el amboceptor específico y la incógnita de la reacción y se obtiene por sangría del enfermo, según expusimos en la pág. 317. Tampoco hemos de añadir nada sobre la preparación de los distintos elementos del sistema hemolítico y su titulación.

Técnica de la reacción. — En muchos Laboratorios acostumbran a poner una serie de cuatro tubos, con cantidades crecientes del suero del enfermo, otra con los mismos tubos y cantidades de un suero sifilítico, y otra de un suero negativo; en otros Laboratorios ponen dos tubos, uno con una décima de suero del enfermo y la dosis correspondiente del antígeno, y otro con dobles cantidades de ambos, pero nosotros aconseja-

mos por su sencillez o la técnica empleada en el Instituto Nacional de Higiene. Cuando la reacción es negativa o dudosa, debe repetirse con dos, tres veces la cantidad del suero del enfermo, según el consejo de Ruediger.

La reacción se practica con arreglo al siguiente cuadro, suponiendo que la dosis de antígeno resultante es la indicada en él:

Tubos.	Solución salina al 8'5/1.000.....	Antígeno al 1/20 (0'05 antígeno por c. c.).	Complemento fresco de cobaya al 1/25 (0'04 comp.° por c. c.)	Suero a investigar (inact.) al 1/10 (0'10 suero por c. c.).....	Suero positivo (inactivo) al 1/10 (0'19 suero por c. c.).....	Suero negativo (inactivo) al 1/10 (0'10 suero por c. c.).....	Mezcla aa. hematíes lavados de carnero al 1/20 y amboceptor anticarnero al 1/10 (0'05 de hematíes y 0'10 de amboceptor).....	Resultado en caso de reacción positiva.
I		1 c. c.	1 c. c.	1 c. c			2 c. c.	Sin hemolisis (si es positiva) con hemolisis (si es negativa)
II	1 c. c.		1 c. c.	1 c. c.			2 c. c.	Hemol. total.
III	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.				2 c. c.	Hemol. total.
IV	2 c. c.			1 c. c.			2 c. c.	Sin hemol.
V		1 c. c.	1 c. c.		1 c. c.		2 c. c.	Sin hemol.
VI	1 c. c.		1 c. c.		1 c. c.		2 c. c.	Hemol. total.
VII		1 c. c.	1 c. c.			1 c. c.	2 c. c.	Hemol. total.
VIII	1 c. c.		1 c. c.			1 c. c.	2 c. c.	Hemol. total.
IX	2 c. c.		1 c. c.				2 c. c.	Hemol. total.

15. Espirilo de la fiebre recurrente.

Se *tiñe* con el violeta anilinado de Ehrlich y con el método de Giemsa y sus modificaciones, pero cuando se emplean las coloraciones ordinarias para los microbios es conveniente qui-

tar previamente la hemoglobina con ácido acético al 5 por 100, lavando bien después y mejor neutralizando con vapores amoniacales o con un líquido débilmente alcalino.

Se cultiva difícilmente en sangre con citrato.

Para su demostración debe extraerse la sangre durante el acceso febril y con ella, en primer término, observar en fresco, poniendo una gota entre porta y cubre, donde los espirilos se denunciarán por sus movimientos; a continuación haremos extensiones que fijaremos y colorearemos como las de sangre con el Giemsa y sus modificaciones y, finalmente, inocularemos a ratas y ratones.

En los cadáveres se encuentra el espirilo de Obermeier preferentemente en el bazo, debiéndose verificar el teñido en los cortes mediante el método de Nikirof, que consiste en teñirlos durante veinticuatro horas en la siguiente mezcla:

Disolución acuosa de azul de metileno.....	10 cent. cúb.
— alcohólica de tropeolina al 1 °/₀..	1 —
— de potasa al 10 °/₀.....	IV gotas.
Agua destilada.....	10 cent. cúb.

con lavado posterior con agua primero, después con alcohol-éter, xilol y montaje.

Abdon
Aceto
Acido

Ac
Ac

ÍNDICE ALFABÉTICO DE MATERIAS Y AUTORES

A

Abdomen, autopsia, 37.
Acetona, fijadores, 62.
Acido clorhídrico, decalcificantes, 63.
» fénico, fijadores, 61.
» nítrico, decalcificantes, 63.
» ósmico, coloración de la grasa, 104.
» pícrico, fijadores, 61.
» sulfídrico, identificación, 306
» sulfuroso, decalcificantes, 63
» tricloracético, decalcificantes, 63.
Actinomicosis, microbio de la, 365.
Achúcarro, método al tanino y plata amoniacal, 179.
Agar alcalino, 370.
Agar-agar, para cultivo, 252.
Aglutinación de las infecciones asociadas, 321.
» de orientación, 320.
» macroscópica, 313.
» microscópica, 319.
Agua concentrada, 372.
» de peptona, 248.
Alcohol, fijador, 59.
Altmann, método de, 94.
Altmann-Schride, método para la sangre, 139.
Alzheimer, método para los exudados, 149.
» método para la neuroglia, 177.
Amiloide, degeneración, 108.
Anaerobios, cultivo de, 273.
» cultivo por absorción, 273.
» cultivo con substancias grasas, 274.
» cultivo en el vacío, 274.
» cultivo por gases inertes, 275.
» cultivo por absorción por ácido pirogálico, 276.
Anglade, método para la neuroglia, 175.
Aislamiento de gérmenes, 277.
» por dilución, 277.
» por diseminación, 288.
» por diseminación en masa, 289.
» por diseminación en superficie con dilución previa, 290.
» por diseminación en superficie con agotamiento, 291.
» por diseminación de los anaerobios, 293.
» por procedimientos biológicos, 294.
» de formas termo-resistentes, 294.
» de microbios resistentes a ciertos agentes químicos, 295.

Aislamiento en condiciones eugenésicas, 296.
» por inoculación, 297.
Anilinas, 84.
Antisépticos, esterilización, 244.
Antitoxia, demostración, 311.
Antracis, bacillus, 363.
Aparato genital, 158.
» urinario, 156.
Arsonval, estufa, 269.
Autoclave, 232.
Autopsia, 1.
» instrumental, 2.
» reglas generales, 8.
» de los animales de experimentación, 284.
Azoulay, método para la mielina, 188.
Azul Berlín, reacción para el hierro, 113.
» de metileno-eosina, coloración de la sangre, 133.
Azur-azul de metileno-eosina, coloración de la sangre, 135.

B

Bactericida *in vitro*, 326.
Bazo, autopsia, 38.
Benda, método para la necrosis grasienta, 155.
» método para las degeneraciones de la mielina, 189.
Berkefeld, bujías, 238.
Bertarelli, Volpino y Boven, método para el espirochete en los cortes, 374.
Best, método para el glucógeno, 107.
Betehg, método de, 360.
Bethe, método para las neurofibrillas, 168.
Bielschowsky, método neurofibrillar, 173.
Biondi-Heidenhaim, método de, 91.
Birsch-Hirschelf, método de coloración de la materia amiloidea, 109.
Blanco, método de, 360.
Blum, método de, 62.
Bordet Gengou, fijación del complemento, 327.
Botulismo, bacilo del, 369.
Bouin, fijador de, 62.
Bunge, modificación del método de Lœffler para flagelos, 220.
Burri, método de fondo negro con tinta china, 203.

C

Cabeza, autopsia, 12.
Cajal, métodos de triple coloración, 37 y 39.
» método bibásico, 91.
» métodos neurofibrillares, 170.
» método al formol-urano, 177.
» método al sublimado-oro, 178.
» método al cloruro de oro, 137.
Calcárea, infiltración, 112.
Caldo común de cultivo, 245.
» común de cultivo, variedades, 248.
Calor húmedo, esterilización, 231.
» seco, esterilización, 228.
Cápsulas suprarrenales, 157.
» teñido de las, 215.
Carbunco sintomático, bacilo del, 369.
Carmín ácido de Mayer, 80.

Carmín borácico, 79.
» de Grenacher, 77.
» de Mayer, 78.
» de Orth, 79.
Casares, método de, 226.
Castellani, hemocultivos, 343.
» método para la aglutinación, 321.
Cerebrotomo, 4.
Claudius, método de, 214.
Cocción, fijadores, 63.
Cochinilla de Czokor, 78.
Cólera morbo asiático, vibrión del, 370.
» nostras, vibrión del, 370.
Coloidea, degeneración, 109.
Coloración simple de los microbios, 207.
Coloraciones granulares, bacilo tuberculoso, 359.
Colorantes acuoso-alcohólicos, 204.
» acuosos para los microbios, 204.
Condensador parabólico para exámenes en fondo negro, 201.
Conradi, medio para el bacilo diftérico, 355.
Conservación de las preparaciones, 101.
» en bálsamo seco, 206.
Corazón, autopsia, 28.
Córnea, degeneración, 113.
Cortes a la celoidina, 73.
» a la parafina, 75.
» en congelación, 66.
» sin inclusión, 65.
Cuadro diferencial de los microbios del grupo Eberth-Coli, 348.
Cuchillete, 4.
Cuchillo de autopsia, 3.
Cuello, autopsia, 35.

Ch

Chamberland, autoclavo de, 232.
» bujías, 238.
» filtro a presión, 241.
Chantemesse, esterilizador, 228.

D

Davidson, método para el espirochete, 374.
Decalcificantes, 63.
Decolorantes, 206.
Degeneración grasienta, 103.
Dieudonné, medio de, 361.
Difteria, bacilo de la, 353.
Disentería, bacilos de la, 347.
Donaggio, método para las neurofibrillas, 169.
Dorset, medio de huevo, 361.
Dosificación de la cantidad a inocular, 232.
Drigalski-Conradi, medio de, 344.
Duggeon, método para el espirochete, 374.
Duodeno, autopsia, 43.

E

Eberth, bacilo de, 342.
Ebullición, esterilización, 231.
Edema maligno, bacilo del, 369.
Ehrlich, método para el glucógeno, 107 y 139.
» triácido, 137.
» método para las granulaciones basófilas, 138.
» indol, 305.
» al azul de metileno, 164.
Elacina, coloración de la, 191.
Encéfalo, extracción, 15.
» autopsia, 16.

Endo, medio de, 345.
Enriquecimiento progresivo, 298.
Epiplón mayor, autopsia, 38.
Eppinger, método para los capilares biliares, 154.
Erlicki, líquido de, 59.
Escalpelos, 4.
Espirilo de la fiebre recurrente, 378.
Espirochete de la sífilis, 373.
Esporos, coloración de, 216.
Esporulación, identificación, 300.
Esputos, examen de los, 150.
Estafilococos, 334.
Esterilización, procedimientos, 227
» por el calor, 227.
» discontinua y prolongada, 234.
Esterilizadores por aire caliente, 228.
Estómago, autopsia, 43.
Estreptococos, 334.
Estufas de cultivo, 264.
» de aire caliente, 264 y 266.
» para temperaturas bajas, 269.
» para observación al microscopio, 271.
Examen exterior, 11.
Experimentación en los animales, 276.
Exudados, examen citológico, 146.
Eyenes y Sternberg, método para el espirochete y otros microbios en los cortes, 376.

F

Fayersztain, método para la mielina, 165.
Fermentación de los hidratos de carbono, identificación, 302.
Fermentación de los hidratos de carbono, cocos, Gram-positivos, 339.
» de los hidratos de carbono, cocos, Gram-negativos, 341.
» de los hidratos de carbono, grupo Eberth-Coli y disentería, 346.
» de los hidratos de carbono, grupo del diftérico, 356.
Ficker, medio de cerebro, 361.
Fijación del complemento, 327.
Fijadores, 59.
Filtración, esterilización, 236.
» con aspiración, 239.
» por presión, 241.
Fischler, método para la necrosis de la grasa, 105.
Flagelos, coloración de los, 218.
Flameado, esterilización, 238.
Flemming, líquido de, 61.
Flormann, método para la actinomicosis, 366.
Foa, líquido de, 61.
Fol, mezcla de, 61.
Formol, fijadores, 62
Formas involutivas, identificación, 302.
Fosforescencia, identificación, 307.
Freud, método para la mielina, 188.
Fusco, método para el espirochete, 374.

G

Gangrena gaseosa, bacilos de la, 369.
Garros, bujías, 237.

Gelatina para cultivo de microbios, 251.
Giemsa, método de, 185.
» método para los cortes, 144
Glucógena, degeneración, 106.
Golgi, método rápido de, 161.
» método lento, 162.
» al sublimado, 163.
Gonococo, 340.
Gota pendiente, examen de los microbios sin teñir, 197.
Gram, método de, 212.
Grasa, eliminación de la, 65.

H

Haug, mezcla de, 63.
Heces, examen citológico, 156.
Heidenhain, métodos de doble coloración, 93.
» método para las glándulas, 155.
Heixheimer-Hübner, método para el espirochete, 374.
Held, método para los grumos cromáticos, 167.
Helly, líquido de, 60.
Henke-Zeller, método de, 73.
Hemateína Mayer, 82.
Hemática, pigmentación, 113.
Hematíes, numeración, 122.
Hematoxilina de Böhmer, 81.
» de Ehrlich, 81.
» de Weigert, 84.
» ferruginosa de Heidenhain, 83.
Hematoxilina-eosina, coloración de la sangre, 132.
Hemocultivos, 342.
Hemolisis, cocos Gram-positivos, 338.
Hesse, medio de, 361.
Hialina, degeneración, 109.
Hígado, autopsia, 43.
Huevos como medio de cultivo, 257.

I

Identificación de los microbios, 299.
Inclusión en celoidina, 68.
» en parafina, 69.
Indol, identificación, 305.
Indurantes para el teñido de los microbios en los cortes, 206.
Inflamación, 116.
Influenza, bacilo de la, 356.
Inoculación, 277.
» cutánea, 279.
» intraocular, 281.
» intramuscular, 280.
» intraperitoneal, 280.
» intrapleural, 281.
» intravascular, 281.
» por las vías digestivas, 282.
» por las vías respiratorias, 282.
» subcutánea, 279.
» subdural, 281.
Intestino, autopsia, 45.
» extracción, 38.
Israel, método para la actinomicosis, 366.

J

Jenner, método de, 133.
Johne, método de, 215.

K

Kaiserling, método de, 49.
Kayser-Conradi, hemocultivo, 243.

Kaplan, método para los axones, 165.
Klein, método de, 217.
Kölliker, método para el hueso, 192.
Königsfeld, diagnóstico precoz de la tifoidea, 343.
Kossa, método para la cal, 112.
Kühne, método de, 210.
Kultschizky, método para la mielina, 185.
Kupffer, método para sus células, 153.

L

Langhans, método para el glucógeno, 107.
Leche como medio de cultivo, 257.
Leishmann, método de, 136.
Lepra, bacilo de la, 365.
Leucocitos, determinación de sus variedades, 140.
» numeración, 124.
Levaditi, método para el espirochete en los cortes, 374.
Levaditi-Manouelian, método rápido para el espipochete en los cortes, 375.
Lipoides, demostración de los, 105.
Líquido cefalorraquídeo, extracción, 147.
Lœffler, líquido de, 205.
» método de, 209.
» método para los flagelos, 219.
» método para el muermo, 367.
» suero de, 255.
Lorrain-Smith, método al azul Nilo, 105.
Lubarsch, método de, 73.
Lugol, líquido de, 213.

M

Mallory, método al azul de anilina, 97.
Marchi, método para las degeneraciones de la mielina, 189.
Martin, filtro, 240.
Material para el análisis bacteriológico e histológico en la autopsia, 46.
May-Grünwld, método de, 133.
Mayer, líquido de, 64.
» método para la mucina, 110.
Medios de cultivo, preparación, 245.
» de cultivo de origen animal, 245.
» de cultivo de origen vegetal, 258.
Meningococo, 340.
Médula espinal, 21.
» ósea, obtención, 142.
» observación en fresco, 143.
» extensiones coloreadas, 144
» estudios en los cortes, 144.
Mesa de autopsias, 5.
Microbios, cultivo, 227.
» examen sin teñir, 197.
» examen en fondo negro, 201.
» incubación, 263.
» métodos de cultivo, 259.
» siembra de los, 259.
Micrococus melitensis, 342.
Microscopio, elección de, 53.
Microtomos, 56.
Miembros, autopsia, 46.
Moeller, método de, 217.
Movilidad, identificación, 300.
Much, método de, 359.
Muermo, bacilo del, 367.
Müller, líquido de, 59.
» método de, 133.

N

Nageotte, método para la mielina, 186.
Necesidad de oxígeno, identificación, 301.
Neisser, coloración de gránulos, 354.
Neutralización a la fenolptaleína, 246.
Nicolle, método a la tionina, 211.
» método al tanino, 211.
» y Morax, modificación al método de Lœfler para flagelos, 220.
Nikirof, método para el espirilo de Obermeir, 379.
Nissl, método de, 166.

O

Observación de los animales, 283.
Orina, examen citológico, 157.
Orth, líquido de, 63.

P

Pal, modificación al método de Weigert para la mielina, 183.
Páncreas, autopsias, 43.
Pappenheim, método panóptico, 137.
Paraganglios, 157.
Parásitos de la sangre, 141.
Paratíficos, bacilos, 342.
Palker y Floyd, mezcla de, 62.
Pasteur, horno, 228.
Pasteurización, 235.
Patatas como medio de cultivo, 258.
Pelvianos, autopsia de los órganos, 41.
Peste bubónica, bacilo de la, 350.
Picro-carmín, 85.
Pfeiffer, bacilo de, 352.
» reacción de, 323.
Piezas de Museo, 48.
Pigmentos, eliminación de los, 65.
» identificación, 307.
Pinzas, 5.
Pinza de Cornet, 198.
Pitres, cortes de, 19.
Placas, investigación de las, 291.
Plaquetas, numeración, 126.
Pneumobacilo, 350.
Pneumococos, 334.
» aislamiento, 377.
Pommer, método para el hueso, 191.
Precipitación, 322.
Pregl, modificación al método de Kuhne, 211.
Preparación del campo operatorio en la inoculación, 273.
» por impresión, 292.
Pulmones, autopsia, 34.
Punción lumbar, 147.
Pus, examen del, 335.
Pústula maligna, bacilo de la, 368.

R

Räbiger, método de, 216.
Ranke, método para la neuroglia, 176.
Raquitomo, 22.
Reconstrucción del cadáver, 50.
Reducción, identificación, 306.
Resistencia a los agentes físicos y químicos, 307.
Ribbert, método de, 216.
» modificación al método de Mallory, 97.
Riñones, autopsia, 40.

Río-Hortega, modificaciones al método de Achúcarro para el conectivo, 98.
» modificación para la neuroglia, 180.
Rojo escarlata, coloración de la grasa, 104.
Rothe, medio de, 357.
Roux, estufa, 264.
» termorregulador, 266.
Russel, método de, 95.

S

Sala de autopsias, 5.
Salkowski, indol, 305.
Sangre, coloración de las extensiones, 131.
» como medio de cultivo, 256.
» examen en preparaciones, 128.
» extracción para examen histológico, 118.
» fijación de las extensiones, 131.
Schallibaum, licor de, 75.
Schimmelbusch, esterilizador, 231.
Schmorl, método para las cápsulas suprarrenales, 158.
» métodos para el hueso, 191 y 92.
Schottmüller, hemocultivos, 343.
Schride, modificación al método de Altmann, 94.
Schultze, método para las oxidasas, 140.
Septicemia hemorrágica, bacilos de la, 350.
Siembras fraccionadas, 298.
Sistema nervioso, 159.
Smith, tubo de, 303.
Spielmeyer, método para la mielina, 187.
Stern y Korte, modificación al método de Neisser para la bactericidia, 328.
Sublimado, fijadores, 60.
Sudan III, coloración de la grasa, 104.
Suero sanguíneo endurecido para cultivo, 254.
Sujeción de los animales de experimentación, 277.

T

Tarozzi, método de, 273.
Temperatura óptima, identificación, 302.
Termorregulador de mercurio, 267.
» de mercurio y éter, 268.
» de membrana, 269.
Terrenos de cultivo, identificación, 302.
Tétanos, bacilo del, 369.
Thiel, medio de, 357.
Thoma, líquido de, 64.
Tijera, 4.
Timo, autopsia, 28.
Tionina, método de la, 92.
Toxinas, formación, 309.
Tuberculosis, bacilo de la, 358.
Tumores, 116.
Turbia, degeneración, 111.
Turk, método para las células cebadas, 139.
Turró, medio de patata, 361.
Tyndalización, 235.

U

Unna, azul polícromo, 95.
» método para las fibras elásticas, 101.

Unna, método para las fibras de elacina, 194.
» método para las fibras epidérmicas, 195.
» método para el muermo, 367.
Unna-Pappenheim, verde de metilo, y pironina, 96.
» » para la sangre, 138.

V

Van Ermengen, método de, 221.
Van Gieson, método de, 86.
Verocay, método de, 96.
Vestido en las autopsias, 7.
Vibriones, 370.
Vincent y Bellot, reacción de, 341.
Violeta de metilo, coloración de la materia amiloide, 108.
Virchow, procedimiento para la autopsia del encéfalo, 17.
Vómito, examen citológico, 156.

W

Wassermann, reacción de, 376.
Weidenrreich-Hamm, método de, 216.
Weigert, método para la actinomicosis, 365.
» método para la mielina, 182.
» modificación al método de Gram, 214.
» para fibras elásticas, 99.
» para la fibrina, 114.
» para la neuroglia, 174.
Weigert-Koch, líquido de, 205.
Weis, método de, 359.
Welcke, método de, 222.
Wiesel, método de, 157.
Wright, método para contar plaquetas, 127.

Z

Zenker, líquido de, 60.
Zettnouw, método de, 222.
Ziehl-Neelsen, líquido de, 205.
» método de, 350.
Zieler, modificación al método de May-Grümwald para los cortes, 145.

UNIVERSITY OF CALIFORNIA LIBRARY
BERKELEY

THIS BOOK IS DUE ON THE LAST DATE STAMPED BELOW

Books not returned on time are subject to a fine of 50c per volume after the third day overdue, increasing to $1.00 per volume after the sixth day. Books not in demand may be renewed if application is made before expiration of loan period.

APR 3 1923

APR 10 1923

JAN 31 1946

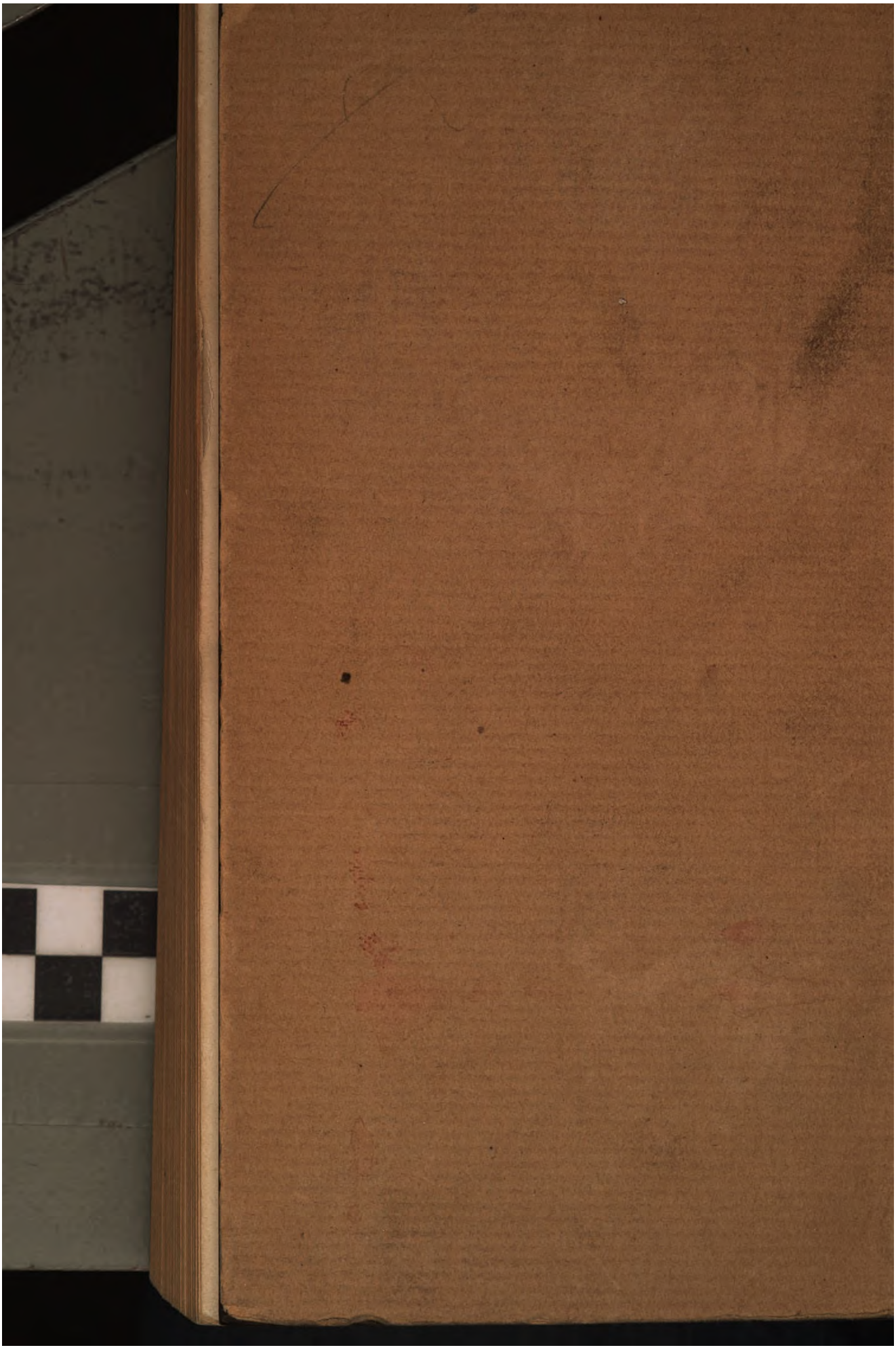
20m-1,'22

409973 BIOLOGY LIBRARY RB26 R3

Ramón Cajal, S.
Manual tecnico de anatomía patológica.

JAN 31 1946 Tafur FEB 2 1946

BIOLOGY LIBRARY
409973 RB26 R3

Ramón

UNIVERSITY OF CALIFORNIA LIBRARY